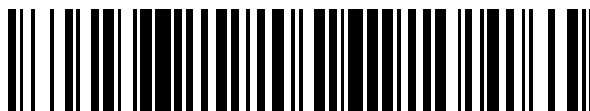


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 478**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13185115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13730764 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2859017**

54 Título: **Anticuerpos que comprenden restos de aminoácidos no naturales de localización específica, métodos para su preparación y métodos para su uso**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657556 P
12.11.2012 US 201261725433 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2019

73 Titular/es:

SUTRO BIOPHARMA, INC. (100.0%)
310 Utah Avenue, Suite 150
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es:

THANOS, CHRISTOPHER D.;
MCEVOY, LESLIE;
YIN, GANG;
PENTA, KALYANI;
BALIGA, RAMESH;
BAJAD, SUNIL;
POLLITT, SONIA;
MURRAY, CHRIS;
STEINER, ALEX y
GILL, AVINASH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 718 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que comprenden restos de aminoácidos no naturales de localización específica, métodos para su preparación y métodos para su uso

5 **Campo**

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden restos de aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica, composiciones que comprenden los anticuerpos, métodos para su producción y métodos para su uso.

Antecedentes

15 Los anticuerpos son moléculas biológicas con una afinidad extraordinaria por sus antígenos diana. La naturaleza proporciona anticuerpos como parte de un sistema de defensa en determinados vertebrados para la eliminación o destrucción de proteínas, células y organismos extraños. Si a un determinado vertebrado se le presenta una proteína extraña en, por ejemplo, una célula infectada o una bacteria infecciosa, un anticuerpo puede unirse a su proteína extraña diana para dirigir a la entidad extraña a su eliminación o destrucción.

20 Se puede usar la afinidad selectiva de los anticuerpos para tener como objetivo casi cualquier antígeno deseado. El antígeno puede ser una proteína en una célula infectada o un microorganismo infeccioso. También puede ser, por ejemplo, una proteína en una célula cancerosa, una proteína en una célula de un tejido diana, una proteína en el torrente circulatorio, una proteína en una célula inflamada o inflamatoria o cualquier otra proteína cuya unión selectiva sea útil. Por lo tanto, los anticuerpos se emplean en la terapia de afecciones tales como el cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y en el rechazo de trasplantes. El anticuerpo puede

25 indicar al sistema inmunitario que destruya o elimine una célula patológica, o un anticuerpo técnicamente diseñado puede portar una carga útil molecular para destruir la diana. En determinadas aplicaciones, los anticuerpos terapéuticos están unidos a escudos moleculares para aumentar su vida útil dentro de un organismo. Los anticuerpos también se emplean en pruebas diagnósticas. Estos anticuerpos pueden portar un marcador para

30 indicar la presencia de un antígeno diana en una célula o en un tejido. Estos marcadores normalmente están unidos a los anticuerpos mediante enlaces covalentes.

Hasta la fecha, las técnicas para unir entidades moleculares de anticuerpos tales como cargas útiles moleculares, escudos moleculares y marcadores se han visto limitadas por su heterogeneidad en el grado y la ubicación de la

35 unión a los anticuerpos, por sus bajos rendimientos y por la pérdida de actividad. Los sitios de conjugación típicos incluyen ubicaciones aleatorias en las cadenas de los anticuerpos, por ejemplo, aminas aleatorias en las cadenas laterales de los aminoácidos, y el extremo N de determinadas cadenas de anticuerpos. En tales técnicas, algunos anticuerpos podrían unirse al conjugado en una ubicación, mientras que algunos anticuerpos se unen al mismo conjugado en otra ubicación, y otros anticuerpos podrían no unirse en absoluto. Hutchins *et al.* (J. Mol. Biol., 406, N.º 4, 595-603) describen un método para incorporar un aminoácido no natural en un anticuerpo. Kazane *et al.* (PNAS, 109, N.º 10, 3731-3736) describen la síntesis de conjugados oligonucleotídicos de anticuerpos de localización específica. El documento WO2010/051056 describe anticuerpos dirigidos contra Fc ϵ psilonRI que comprenden aminoácidos no naturales en una o más posiciones diversas.

45 Existe la necesidad de anticuerpos modificados en posiciones de localización específica optimizados en cuanto a la uniformidad, rendimiento y/o actividad, para impulsar el uso prometedor de anticuerpos en, por ejemplo, terapia y diagnóstico.

Sumario

50 En el presente documento se proporcionan anticuerpos modificados en una o más posiciones de localización específica con uno o más restos de aminoácido no naturales, tal como se define en las reivindicaciones. Estas posiciones de localización específica son óptimas para la sustitución de un resto de aminoácido natural por un resto de aminoácido no natural. En determinadas realizaciones, la sustitución en estas posiciones de localización

55 específica produce anticuerpos que son uniformes en la sustitución, es decir, que están sustancialmente modificados en la posición seleccionada. En determinadas realizaciones, un anticuerpo sustituido en una o más de estas posiciones de localización específica tiene un rendimiento de producción ventajoso, una solubilidad ventajosa, una unión ventajosa y/o una actividad ventajosa. Las propiedades de estos anticuerpos se describen en detalle en las secciones a continuación.

60 En un aspecto, en el presente documento se proporcionan anticuerpos de la clase IgG que comprenden una cadena polipeptídica que tiene uno o más restos de aminoácido no naturales en sitios específicos seleccionados del grupo que consiste en el resto de la cadena ligera L7 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia, los restos de la cadena pesada H404, H121, H180 y H136 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE, o una variante modificada postraduccionally del mismo, en donde la modificación postraduccionally es un enlace disulfuro intercatenario, un enlace disulfuro intracatenario, glucosilación unida en N, fosforilación, glucosilación unida

65

en O, metilación, acetilación, lipidación, anclaje de GPI, miristoilación o prenilación. El anticuerpo puede ser cualquier polipéptido o polipéptido multimérico reconocido como un anticuerpo por los expertos en la materia. La cadena polipeptídica puede ser cualquier cadena polipeptídica del anticuerpo, incluyendo cualquier cadena pesada y cualquier cadena ligera. La posición en la cadena polipeptídica que es sustituible de forma óptima es cualquier

5 posición en la cadena polipeptídica que pueda proporcionar una sustitución con un rendimiento, uniformidad, solubilidad, unión y/o actividad óptimos. Las secciones a continuación describen en detalle las posiciones sustituibles de forma óptima de tales cadenas polipeptídicas. Además se describen a continuación anticuerpos útiles, aminoácidos no naturales útiles.

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

En el presente documento también se describen métodos de fabricación de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden fabricarse mediante cualquier técnica obvia para los expertos en la materia de incorporación de aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica de cadenas de anticuerpos. En determinados ejemplos, los anticuerpos se fabrican por síntesis en fase sólida, semisíntesis, traducción *in vivo*, traducción *in vitro* o traducción sin células.

20

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos para terapia. Por lo tanto, se proporcionan los anticuerpos de la invención, para su uso en terapia. Los anticuerpos dirigidos a una diana terapéutica pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales de localización específica de acuerdo con la descripción en el presente documento. Estos anticuerpos pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada a la diana terapéutica. Ventajosamente, se puede usar un aminoácido no natural específico de sitio para unir el anticuerpo a una carga útil terapéutica, para facilitar la eficacia. En el presente documento se describen anticuerpos a modo de ejemplo, dianas terapéuticas y enfermedades o afecciones.

25

30

Además se describen métodos de uso de los anticuerpos para detección. Los anticuerpos dirigidos a una diana de detección pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales de localización específica de acuerdo con la descripción en el presente documento. Estos anticuerpos se pueden usar con un marcador para señalar la unión a la diana de detección. Ventajosamente, se puede usar un aminoácido no natural específico de sitio para unir el anticuerpo a un marcador para facilitar la detección. En el presente documento se describen anticuerpos a modo de ejemplo, dianas de detección y marcadores.

35

En el presente documento también se describen métodos de modificación de la estabilidad de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden modificarse con un aminoácido no natural, como se describe en el presente documento, para facilitar la unión a una entidad molecular que puede modificar la estabilidad del anticuerpo. Por ejemplo, un aminoácido no natural específico de sitio puede facilitar la unión a un escudo molecular, por ejemplo, polietilenglicol, para aumentar la estabilidad de un anticuerpo. Los aminoácidos no naturales y fracciones de unión a modo de ejemplo se describen en el presente documento.

40

45

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 proporciona la estructura del reactivo citotóxico a modo de ejemplo DBCO-MMAF.

50 La FIG. 2 proporciona un perfil de ensayo de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) de pico único.

La FIG. 3 proporciona un perfil de ensayo CIH no bien resuelto (NBR).

55 La FIG. 4 proporciona un perfil de ensayo CIH bien resuelto (BR).

Las FIG. 5A y 5B representan los trazados de CIH a modo de ejemplo de dos variantes (HC T110 y HC S112), que muestran picos que corresponden a IgG no conjugadas, parcialmente conjugadas y totalmente conjugadas.

60 Las FIG. 6A-6E representan realizaciones a modo de ejemplo que muestran la conjugación específica del sitio.

Las FIG. 7A y 7B representan la eficacia de supresión y los datos de comparación del rendimiento soluble de anticuerpos que comprenden distintos aminoácidos no naturales

65 La FIG. 8 representa la destrucción celular de líneas celulares positivas para CD-30 por conjugados de anticuerpo brentuximab-fármaco a modo de ejemplo.

La FIG. 9 proporciona resultados experimentales que demuestran que los conjugados de anticuerpo de brentuximab-fármaco a modo de ejemplo no destruyen células que no expresan CD-30.

5 La FIG. 10 representa la unión a líneas celulares positivas para CD-30 de conjugados de anticuerpo brentuximab (ADCETRIS®)-fármaco a modo de ejemplo.

Las FIG. 11A, 11B, 11C y 11D proporcionan la estructura de los reactivos citotóxicos a modo de ejemplo DBCO-MMAF 2, DBCO-DM4, DBCO-DM4 2 y DBCO-MMAE, respectivamente.

10 La FIG. 12 proporciona una representación gráfica de la farmacocinética de un conjugado de un anticuerpo específico de sitio scFv-Fc-fármaco.

15 Las FIG. 13A y 13B representan una representación gráfica de la eficacia *in vivo* de conjugados de anticuerpo específico de sitio-fármaco a modo de ejemplo para retardar el crecimiento tumoral y/o para remitir el tamaño tumoral en un modelo animal.

Descripción de las realizaciones a modo de ejemplo

20 En el presente documento se proporcionan anticuerpos que tienen aminoácidos no naturales en una o más posiciones de localización específica, composiciones que comprenden los anticuerpos, métodos para fabricar los anticuerpos y métodos para su uso.

Definiciones

25 Cuando se hace referencia a los anticuerpos proporcionados en el presente documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados salvo que se indique otra cosa. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia. En el caso en el que exista una pluralidad de definiciones para un término en el presente documento, a menos que se indique otra cosa, prevalecen las indicadas en esta sección.

30 Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una”, y “el/la”, incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un “anticuerpo” es una referencia a uno o más de tales anticuerpos, etc.

35 La expresión “sustancialmente puro” con respecto a una composición que comprende un anticuerpo se refiere a una composición que incluye al menos el 80, 85, 90 o 95 % en peso o, en determinadas realizaciones, el 95, 98, 99 o 100 % en peso, por ejemplo, en peso seco, del anticuerpo, con respecto a la porción restante de la composición. El porcentaje en peso puede ser con respecto al peso total de proteína en la composición o con respecto al peso total de anticuerpos en la composición. La pureza puede determinarse mediante técnicas obvias para los expertos en la materia, por ejemplo, SDS-PAGE.

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

50 El término “anticuerpo” se refiere a cualquier macromolécula que los expertos en la materia reconocerían como un anticuerpo. Los anticuerpos comparten propiedades comunes que incluyen la unión y al menos una cadena polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una cadena polipeptídica que puede codificar cualquiera de los genes de inmunoglobulina reconocidos por los expertos en la materia. Los genes de inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, los genes de las regiones constantes de κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), δ , ϵ y μ , así como los genes de las regiones variables de inmunoglobulinas. El término incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo reconocidos por los expertos en la materia, y variantes de los mismos. El término incluye adicionalmente anticuerpos glucosilados y no glucosilados.

60 La expresión “fragmento de anticuerpo” se refiere a cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo en el presente documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, y los anticuerpos que se han diseñado técnicamente. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, a Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv monocatenario (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de las CDR, las regiones variables, las regiones marco conservadas, las regiones constantes, y similares (Maynard y Georgiou, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-76; Hudson, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:395-402).

El término "inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos que codifica sustancialmente uno de los genes de inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente idéntica a la misma en la secuencia de aminoácidos. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener varias formas estructurales, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales incluyendo, pero sin limitación, V_H, C_γ1, C_γ2, C_γ3, V_L, y C_L.

La expresión "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se refiere a un dominio de proteína que consiste en un polipéptido que codifica sustancialmente un gen de inmunoglobulina. Los dominios de Ig incluyen, pero sin limitación a V_H, C_γ1, C_γ2, C_γ3, V_L, y C_L.

La expresión "región variable" de un anticuerpo se refiere a un polipéptido o polipéptidos compuestos por el dominio de inmunoglobulina V_H, los dominios de inmunoglobulina V_L o los dominios de inmunoglobulina V_H y V_L. Región variable puede referirse a este o estos polipéptidos aislados, como un fragmento F_v, como un fragmento scF_v, como esta región en el contexto de un fragmento de anticuerpo más grande, o como esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o una molécula de armazón alternativa que no sea de anticuerpo.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (las CDR) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan "regiones marco conservadas" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β, conectadas por tres o cuatro CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

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

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

La expresión "anticuerpo parental" se refiere a un anticuerpo conocido por los expertos en la materia que se modifica de acuerdo con la descripción proporcionada en el presente documento. La modificación puede ser física, es decir, el reemplazo o modificación de forma química o bioquímica de uno o más aminoácidos del anticuerpo parental para producir un anticuerpo dentro del alcance de la presente descripción. La modificación también puede ser conceptual, es decir, utilizar la secuencia de una o más cadenas polipeptídicas del anticuerpo parental para diseñar un anticuerpo que comprenda uno o más aminoácidos no naturales específicos de sitio de acuerdo con la presente descripción. Los anticuerpos parentales pueden ser anticuerpos de origen natural o anticuerpos diseñados o desarrollados en un laboratorio. Los anticuerpos parentales también pueden ser anticuerpos artificiales o técnicamente diseñados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados.

La expresión "variante conservativamente modificada" se refiere a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo relacionado por sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en un péptido, polipéptido o secuencia de proteína que alteran, añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa", donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservativamente son adicionales a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos interespecíficos y alelos de la invención.

Los ocho grupos siguientes contienen, cada uno, aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);
2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

6) Fenilalanina (L), Tirosina (Y), Triptófano (W);

7) Serina (S), Treonina (T); y

8) Cisteína (C), Metionina (M)

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

Los términos "idéntica" o "identidad," en el contexto de describir dos o más secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de restos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente el 60 % de identidad, opcionalmente, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 % de identidad a lo largo de una región específica), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada según se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. La identidad puede existir lo largo de una región que es de al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o a lo largo de una región que es de 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud o, cuando no se especifique, a través de toda la secuencia o un polipéptido. En el caso de anticuerpos, la identidad se puede medir fuera de las CDR variables. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, incluyendo, pero sin limitación, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa 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 usa como valores predeterminados una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

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. USA* 90:5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos 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 ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferentemente menor que aproximadamente 0,01 y muy preferentemente menor que aproximadamente 0,001.

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

Los aminoácidos de codificados de forma natural son los aminoácidos proteinogénicos conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y los menos comunes pirrolisina y selenocisteína. Los aminoácidos codificados

de forma natural incluyen variantes postraduccionales de los 22 aminoácidos de origen natural, tales como aminoácidos prenilados, aminoácidos isoprenilados, aminoácidos miristoilados, aminoácidos palmitoilados, aminoácidos glucosilados unidos en N, aminoácidos glucosilados unidos en O, aminoácidos fosforilados y aminoácidos acilados.

5 La expresión "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es un aminoácido proteínogénico, o una variante del mismo modificada postraduccionalmente. En particular, la expresión se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína, o variantes modificadas postraduccionalmente de los mismos.

10 Un "factor de liberación proteico 1 (RF1) funcional" se refiere a RF1 que conserva una actividad igual o esencialmente similar a la proteína RF1 de tipo silvestre o no modificada. La actividad de RF1 funcional se puede analizar, por ejemplo, midiendo la velocidad de crecimiento de las bacterias que expresan la proteína RF1 modificada y comparando la velocidad de crecimiento con la de las bacterias que expresan RF1 de tipo silvestre o no modificada. La actividad de RF1 funcional también se puede analizar, por ejemplo, por la capacidad de la proteína RF1 modificada para reducir la incorporación de ARNt ortogonal de un AAnn (aminoácidos no naturales) en una posición específica de un ARNm que codifica una proteína diana, aumentando de este modo la cantidad de terminación prematura de la cadena (es decir, aumentando la cantidad de proteína truncada).

20 Un "factor de liberación proteico 1 (RF1) atenuado" se refiere a una RF1 modificada que conserva una actividad reducida con respecto a la proteína RF1 de tipo silvestre o no modificada. La actividad de RF1 se puede analizar, por ejemplo, midiendo la velocidad de crecimiento de las bacterias que expresan la proteína RF1 modificada y comparando la velocidad de crecimiento con la de las bacterias que expresan RF1 de tipo silvestre o no modificada. La actividad de RF1 también se puede analizar, por ejemplo, por la capacidad de la proteína RF1 modificada para reducir la incorporación de ARNt ortogonal de un AAnn (aminoácidos no naturales) en una posición específica de un ARNm que codifica una proteína diana, aumentando de este modo la cantidad de terminación prematura de la cadena (es decir, aumentando la cantidad de proteína truncada). En algunas realizaciones, la proteína RF1 atenuada comprende modificaciones transcripcionales; por ejemplo, el nivel de expresión de la proteína RF1 (tipo silvestre o modificada) se puede reducir para lograr la atenuación. La reducción también se puede lograr utilizando tecnologías de ARNi. En algunas realizaciones, la proteína RF1 atenuada comprende modificaciones traduccionales; por ejemplo, se puede reducir la cantidad de la proteína RF1 sintetizada (de tipo silvestre o modificada) para lograr la atenuación, por ejemplo, aumentando la velocidad a la que la proteína es digerida por una proteasa a través de la inserción de la secuencia específica para la proteasa en la secuencia de RF1.

35 *Anticuerpos*

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden uno o más restos de aminoácido no naturales en posiciones de localización específica en la secuencia de aminoácidos de al menos una cadena polipeptídica.

40 El anticuerpo puede compartir una alta identidad de secuencia con cualquier anticuerpo reconocido por los expertos en la materia, es decir, un anticuerpo parental. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es idéntica a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental, distinta de los aminoácidos no naturales en la posición de localización específica. En realizaciones adicionales, el anticuerpo proporcionado en el presente documento puede tener una o más inserciones, deleciones o mutaciones con respecto al anticuerpo parental además de los uno o más aminoácidos no naturales en las posiciones de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una secuencia primaria exclusiva, siempre que sea reconocido como un anticuerpo por los expertos en la materia.

50 El anticuerpo es, normalmente, una proteína que comprende múltiples cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un heterotetrámero que comprende dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera puede estar unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. Cada cadena pesada puede estar unida a la otra cadena pesada mediante uno o más enlaces disulfuro covalentes. Cada cadena pesada y cada cadena ligera también puede tener uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Como conocen los expertos en la materia, cada cadena pesada comprende normalmente un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera comprende normalmente un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante. Como conocen los expertos en la materia, normalmente los anticuerpos tienen afinidad selectiva por sus moléculas diana, es decir, los antígenos.

60 Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden tener cualquier forma de anticuerpo conocida por los expertos en la materia. Pueden ser de longitud completa o fragmentos. La divulgación describe anticuerpos de longitud completa que incluyen IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, etc. Además se describe fragmentos que incluyen Fv, Fab, Fc, sFv, etc.

65 Los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden al menos un aminoácido no natural. El aminoácido no natural puede ser cualquier aminoácido no natural conocido por los expertos en la materia. Los

aminoácidos no naturales a modo de ejemplo se describen en las siguientes secciones.

Los aminoácidos no naturales se colocan en ubicaciones seleccionadas en una cadena polipeptídica del anticuerpo. Estas ubicaciones se identificaron como que proporcionan sitios óptimos para la sustitución con los aminoácidos no naturales. Cada sitio tiene la capacidad de portar un aminoácido no natural con una estructura, función y/o métodos óptimos para producir el anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que es estable. La estabilidad puede medirse mediante cualquier técnica obvia para los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene propiedades funcionales óptimas. Por ejemplo, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de afinidad de unión por su antígeno diana, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar unión potenciada, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que puede fabricarse ventajosamente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo muestra propiedades ventajosas en sus métodos de síntesis, analizadas a continuación. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de rendimiento en la producción, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar un rendimiento potenciado, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de supresión por ARNt, descrito a continuación, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una supresión por ARNt potenciada, descrito a continuación, en la producción, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene solubilidad ventajosa. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de solubilidad, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una solubilidad potenciada, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene una expresión ventajosa. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de expresión, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una expresión potenciada, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene un plegamiento ventajoso. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar poca o ninguna pérdida de plegamiento apropiado, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar un plegamiento potenciado, en comparación con un anticuerpo sin el aminoácido no natural de localización específica.

En determinadas realizaciones, una posición de localización específica para la sustitución proporciona un anticuerpo que tiene capacidad de una conjugación ventajosa. Como se describe a continuación, varios aminoácidos no naturales tienen cadenas laterales o grupos funcionales que facilitan la conjugación del anticuerpo a un segundo agente, directamente o a través de un enlazador. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una eficacia de conjugación potenciada, en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar un rendimiento de conjugación potenciado, en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones. En determinadas realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una especificidad de conjugación potenciada, en comparación con un anticuerpo sin los mismos u otros aminoácidos no naturales en otras posiciones.

El uno o más aminoácidos no naturales se localizan en posiciones de localización específica seleccionadas en al menos una cadena polipeptídica del anticuerpo. La cadena polipeptídica puede ser cualquier cadena polipeptídica del anticuerpo, sin limitación, incluyendo la cadena ligera o la cadena pesada. La posición de localización específica puede estar en cualquier dominio del anticuerpo, incluyendo cualquier dominio variable y cualquier dominio constante.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden un aminoácido no natural en una posición de localización específica. En determinadas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden dos aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica. En determinadas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden

tres aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica. En determinadas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden más de tres aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica.

5 La presente divulgación describe las posiciones de localización específica para la sustitución que se pueden describir con cualquier sistema de nomenclatura de anticuerpos conocido por los expertos en la materia. En el sistema de numeración de Kabat, estas posiciones están en los restos de la cadena pesada H005, H023, H042, H065, H074 y H084. En el sistema de numeración de la UE, estas posiciones están en los restos de la cadena pesada H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436 y H438. En otras palabras, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005, H023, H042, H065, H074 y H084, y de los restos de la UE H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436 y H438.

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

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005, H023 e H084; y los restos de la UE H118, H119, H132, H134, H136, H137, H160, H162, H172, H239, H241, H267, H269, H270, H271, H272, H282, H286, H292, H293, H296, H298, H329, H330, H334, H335, H340, H355, H359, H386, H389, H404, H420, H421, H438 y H342.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005 y H084; y los restos de la UE H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359 y H389.

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

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H042 y H065; y los restos de la UE H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H342, H356, H358, H360, H383, H384 H404 y H436.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de UE que corresponden a H292- H301, H303 y H305.

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

5 H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H342, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H404, H420, H421, H436 y H438.

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

15 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H005 y H084; los restos de la UE H118, H132, H136, H239, H293, H334, H342, H355, H359, H389 y H404.

20 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de UE que corresponden a H292-H301, H303 y H305.

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

30 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H042 y H065; y los restos de la UE H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H342, H356, H358, H360, H383, H384, H404 y H436.

35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H005, H023 y H084 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H118, H119, H132, H134, H136, H137, H160, H162, H172, H239, H241, H267, H269, H270, H271, H272, H282, H286, H292, H293, H296, H298, H329, H330, H334, H335, H340, H355, H359, H386, H389, H404, H420, H421, H438 y H342, de acuerdo con el esquema de
40 numeración de la UE.

45 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos L043, L049, L056, L057, L060, L067 y L068 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L109, L112, L114, L144, L153, L156, L157, L168, L184, L202, L203 y L206, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos L043, L049, L056, L057, L060, L067 y L068 de acuerdo con el
50 esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L109, L112, L114, L144, L153, L156, L168, L184, L202 y L203, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos L049, L056, L057, L060 y L067 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L109, L153, L202 y
55 L203, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

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

65 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H023 y H084, de acuerdo con el

esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H118, H119, H135, H136, H137, H160, H161, H162, H164, H195, H197, H219, H282, H296, H335, H361, H422, H440, H267, H272, H274, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H342, H343, H355, H362, H392, H404, H424, H438, H442 y H443, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

5 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H023 y H084, de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H118, H119, H135, H136, H137, H160, H161, H162, H195, H197, H219, H282, H296, H422, H440, H267, H272, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H342, H355, H392, H404, H424, H438, H442 y H443, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H023 y H084, de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H118, H119, H135, H136, H160, H162, H195, H219, H282, H296, H267, H293, H297, H298, H303, H305, H334, H340, H341, H392 y H438, H442, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

15 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H051, H052, H053, H056, H070, H082A, H098, H100, H110 y H112, de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H180, H184, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232 y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H052, H070, H082A, H100, H110 y H112 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H180, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232 y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H042, H003, H007, H014, H016, H019, H025, H040, H043, H052, H070, H082A, H100, H110 y H112 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H180, H190, H192, H214, H216, H221, H222, H225, H227, H230, H231, H232 y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H007, H014, H019, H025, H040, H043, H052, H070, H100, H110 y H112 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H180, H214, H216, H222, H227, H230, H231, H232 y H236, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

20 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079 y L107 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L138, L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 y L201, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos menos 1, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079 y L107 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 y L201, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079 y L107 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L142, L152, L171, L182, L188 y L199, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos menos 1, L005, L007, L008, L016, L017, L018, L020, L022, L027, L045, L058, L063, L077, L079 y L107 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L142, L152, L182, L188 y L199, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L016 y L063 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y el resto L199, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H019, H025, H051, H070, H098, H110 y H112 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H136, H180, H187, H190, H214, H216, H221 y H222, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

60 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L014 y L070 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L138, L142, L143 y

L152, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos H019, H025, H051, H070, H077, H079, H098, H110 y H112 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos H121, H136, H180, H187, H190, H214, H216, H221 y H222, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063 y L070 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat o Chothia; y los restos L138, L142, L143, L152 y L201, de acuerdo con el esquema de numeración de la UE.

Las posiciones de localización específica también se pueden identificar con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de referencia. Por ejemplo, en la SEQ ID NO:1 se proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de referencia.

El anticuerpo puede comprender una cadena polipeptídica que tiene al menos el 70 %, 80 % o 90 % de homología con la SEQ ID NO:1 y que tiene uno o más restos de aminoácidos no naturales en sitios específicos seleccionados del grupo que consiste en los sitios que corresponden a los restos 407, 124, 183 y 139 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1, o una variante modificada postraduccionalmente del mismo, como se define en la reivindicación 1. En la cadena pesada de referencia, las posiciones de localización específica están en los restos. 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 407, 423, 424, 439 y 441. En otras palabras, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 407, 423, 424, 439 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

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

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 5, 23, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 163, 165, 168, 175, 242, 244, 270, 273, 274, 275, 285, 289, 295, 296, 299, 300, 301, 332, 333, 337, 338, 343, 345, 358, 362, 389, 407, 423, 424 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 5, 88, 121, 135, 139, 242, 296, 337, 358, 362 y 392 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 75, 122, 137, 138, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 358, 378, 389, 395, 401, 407, 423, 424 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 42, 66, 141, 158, 177, 179, 180, 222, 241, 246, 265, 267, 268, 281, 359, 361, 363, 386, 387, 407 y 439 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 292-301, 303 y 305 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 88, 121, 122, 138,

139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 292, 299, 333, 338, 364, 403, 407, 425, 443, 263, 270, 271, 275, 277, 295, 296, 300, 301, 306, 308, 335, 336, 337, 343, 344, 345, 346, 358, 365, 389, 395, 407, 427, 441, 445 y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

5 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 299, 338, 364, 425, 443, 270, 275, 277, 295, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 346, 358, 365, 395, 407, 427, 441, 445 y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

10 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 167, 198, 200, 222, 285, 299, 364, 425, 443, 270, 275, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 358, 365, 395, 407, 427, 441, 445 y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

15 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 140, 163, 164, 165, 198, 200, 222, 285, 299, 425, 443, 270, 275, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 345, 358, 395, 407, 427, 441, 445 y 446 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

20 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 23, 88, 121, 122, 138, 139, 163, 165, 198, 222, 285, 299, 270, 296, 300, 301, 306, 308, 337, 343, 344, 395, 407 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

25 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 42, 3, 7, 14, 16, 19, 25, 40, 43, 51, 52, 54, 57, 71, 84, 102, 104, 114, 119, 124, 183, 187, 193, 195, 217, 219, 224, 225, 228, 230, 233, 234, 235 y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

30 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 42, 3, 7, 14, 16, 19, 25, 40, 43, 52, 54, 57, 71, 84, 104, 114, 119, 124, 183, 193, 195, 217, 219, 224, 225, 228, 230, 233, 234, 235 y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 7, 14, 19, 25, 40, 43, 52, 71, 104, 114, 119, 124, 183, 195, 217, 219, 230, 233, 234, 235 y 239 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

40 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 138, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

45 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

50 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 152, 171, 182, 188 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

55 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 5, 7, 8, 16, 17, 18, 20, 22, 27, 45, 58, 63, 77, 79, 107, 142, 152, 182, 188 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

60 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 16, 63 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

65

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 19, 25, 51, 71, 102, 114, 119, 124, 139, 183, 187, 193, 217, 219, 224 y 225 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

5 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 14, 70, 138, 142, 143 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

10 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 19, 25, 51, 71, 78, 80, 102, 114, 119, 124, 139, 183, 187, 193, 217, 219, 224 y 225 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

15 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 70, 138, 142, 143, 152 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

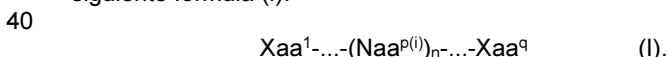
20 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 114, 144, 153, 156, 157, 168, 184, 202, 203 y 206 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

25 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 144, 153, 156, 168, 184, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

30 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 144, 153, 156, 184, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas de las que corresponden a 49, 56, 57, 60, 67, 109, 153, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

En determinados ejemplos, el anticuerpo comprende una cadena polipeptídica que se puede describir mediante la siguiente fórmula (I):



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

60 El análisis de los datos de la exploración de TAG como se presenta en los Ejemplos permitió la selección de sitios que son candidatos ideales para fabricar los ADC (forma siglada de *antibody drug conjugate*, conjugado de anticuerpo y fármaco) en función de la destrucción celular, los niveles de expresión, la relación de fármaco con respecto al anticuerpo, la accesibilidad al disolvente y la estabilidad térmica (cuando esté disponible). Los sitios más preferentes tienen menor accesibilidad al solvente y mayor termoestabilidad que las otras variantes analizadas. Los sitios preferentes para la incorporación de AAnn se enumeran a continuación en la Tabla I.

Tabla I: Sitios preferentes para la incorporación de AAnn

Sitio del AAnn	Preferencia
HC-F404	Muy preferente
HC-K121	Muy preferente
HC-S136	Muy preferente
HC-Y180	Muy preferente
HC-F241	Muy preferente
LC-T22	Muy preferente
LC-S7	Muy preferente
LC-N152	Muy preferente
HC-S25	Más preferente
HC-A40	Más preferente
HC-S119	Más preferente
HC-S190	Más preferente
HC-K222	Más preferente
HC-R19	Preferente
HC-Y52	Preferente
HC-S70	Preferente

5 Por consiguiente, en determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos de cadena pesada o cadena ligera HC-F404 de la UE, HC-K121 de la UE, HC-Y180 de la UE, HC-F241 de la UE, LC-T22 de Kabat o Chothia, LC-S7 de Kabat o Chothia, LC-N152 de la UE, HC-S136 de la UE, HC-S25 de Kabat o Chothia, HC-A40 de Kabat o Chothia, HC-S119 de la UE, HC-S190 de la UE, HC-K222 de la UE, HC-R19 de Kabat o Chothia, HC-Y52 de Kabat o Chothia, o HC-S70 de Kabat o Chothia, o una variante modificada postraduccionalmente de los mismos.

10 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos de cadena pesada o cadena ligera HC-F404 de la UE, HC-K121 de la UE, HC-Y180 de la UE, HC-F241 de la UE, LC-T22 de Kabat o Chothia, LC-S7 de Kabat o Chothia, LC-N152 de la UE, HC-S136 de la UE, HC-S25 de Kabat o Chothia, HC-A40 de Kabat o Chothia, HC-S119 de la UE, HC-S190 de la UE y HC-K222 de la UE, o una variante modificada postraduccionalmente de los mismos.

20 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en los restos de cadena pesada o cadena ligera HC-F404 de la UE, HC-K121 de la UE, HC-Y180 de la UE, HC-F241 de la UE, LC-T22 de Kabat o Chothia, LC-S7 de Kabat o Chothia, LC-N152 de la UE y HC-S136 de Kabat o Chothia, o una variante modificada postraduccionalmente de los mismos.

25 En determinados ejemplos, en el presente documento se proporcionan adicionalmente variantes conservativamente modificadas de los anticuerpos anteriores. Las variantes conservativamente modificadas de un anticuerpo incluyen una o más inserciones, deleciones o sustituciones que no alteran la estructura y/o la función del anticuerpo cuando las evalúa un experto en la materia. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 20 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 15 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 10 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 9 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 8 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 7 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 6 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 5 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 4 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 3 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 2 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 1 inserción, deleción o sustitución de aminoácido. En realizaciones particulares, las sustituciones son conservativas, sustituyendo un aminoácido dentro de la misma

clase, como se describe anteriormente.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden modificarse para modular la estructura, la estabilidad y/o la actividad. En tales realizaciones, las modificaciones pueden ser conservativas o que no sean conservativas. Las modificaciones solo necesitan ser adecuadas para el experto que lleva a cabo los métodos y que utiliza las composiciones descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, las modificaciones disminuyen pero no eliminan la afinidad de unión al antígeno. En determinadas realizaciones, las modificaciones aumentan la afinidad de unión al antígeno. En determinadas realizaciones, las modificaciones potencian la estructura o la estabilidad del anticuerpo. En determinadas realizaciones, las modificaciones reducen pero no eliminan la estructura o la estabilidad del anticuerpo. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 20 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 15 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 10 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 9 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 8 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 7 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 6 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 5 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 4 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 3 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 2 o menos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 1 inserción, deleción o sustitución de aminoácido.

Además, dentro del alcance se encuentran variantes modificadas postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales de los anticuerpos típicas incluyen enlaces disulfuro intercatenarios, enlaces disulfuro intracatenarios, glucosilación unida en N. En el presente documento se describe la proteólisis. Además se proporcionan en el presente documento otros anticuerpos modificados postraduccionales que tienen modificaciones tales como fosforilación, glucosilación unida en O, metilación, acetilación, lipidación, anclaje de GPI, miristoilación y prenilación. La modificación postraducciona puede producirse durante la producción, *in vivo*, *in vitro* o de otro modo. En determinadas realizaciones, la modificación postraducciona puede ser una modificación intencional por parte de un experto, por ejemplo, utilizando los métodos proporcionados en el presente documento.

Adicionalmente, están incluidos dentro del alcance anticuerpos fusionados a péptidos o polipéptidos adicionales. Las fusiones a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un metionil anticuerpo en el que una metionina está unida al extremo N del anticuerpo resultante de la expresión recombinante, fusiones con el fin de purificación (incluyendo, pero sin limitación, a epítopos de polihistidina o de afinidad), fusiones con el fin de enlazar a otras moléculas biológicamente activas, fusiones con péptidos de unión a seroalbúmina sérica y fusiones con proteínas séricas tal como la seroalbúmina. Los anticuerpos pueden comprender secuencias de escisión para proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero sin limitación, FLAG, poli-His, GST, etc.). Los anticuerpos también pueden comprender moléculas unidas (incluyendo, pero sin limitación, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero sin limitación, GFP), la purificación u otras características del anticuerpo. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden una secuencia de afinidad C-terminal que facilita la purificación de anticuerpos de longitud completa. En determinadas realizaciones, tal secuencia de afinidad C-terminal es una secuencia de poli-His, por ejemplo, una secuencia de 6-His.

El anticuerpo puede tener cualquier forma de anticuerpo reconocida por los expertos en la materia. El anticuerpo puede comprender una única cadena polipeptídica, una única cadena pesada o una única cadena ligera. Además, el anticuerpo puede formar multímeros que serán reconocidos por los expertos en la materia, incluyendo homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros. Estos multímeros pueden estar unidos o no. Los enlaces útiles incluyen enlaces disulfuro intercatenarios típicos de las moléculas de anticuerpos. Los multímeros también pueden estar unidos mediante otros aminoácidos, incluyendo los aminoácidos no naturales introducidos de acuerdo con la presente descripción. La presente divulgación describe una inmunoglobulina tal como de cualquier clase o subclase, incluyendo IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. El anticuerpo puede estar en forma de cualquier fragmento de anticuerpo incluyendo Fv, Fc, Fab, y (Fab')₂ y scFv.

El anticuerpo puede estar, adicionalmente, glucosilado o no estar glucosilado. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el anticuerpo está glucosilado. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no está glucosilado. Pueden fabricarse anticuerpos no glucosilados que comprenden un aminoácido no natural, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos proporcionados en el presente documento o a través de sistemas de expresión bacterianos conocidos por los expertos en la materia. Pueden fabricarse anticuerpos glucosilados que comprenden un aminoácido no natural, por ejemplo, como se describe en Axup *et al.*, 2012, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109(40):16101-16106.

En el presente documento también se proporcionan anticuerpos que están conjugados con una o más fracciones de

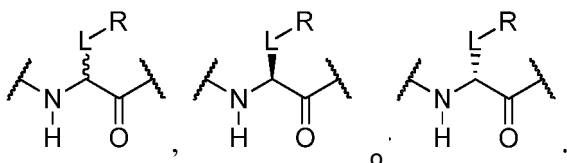
conjugación. La fracción de conjugación puede ser cualquier fracción de conjugación que un experto en la técnica considere útil. Por ejemplo, la fracción de conjugación puede ser un polímero, tal como polietilenglicol, que pueda mejorar la estabilidad del anticuerpo *in vitro* o *in vivo*. La fracción de conjugación puede tener actividad terapéutica, produciendo de este modo un conjugado de anticuerpo-fármaco. La fracción de conjugación puede ser una carga útil molecular que sea perjudicial para las células diana. La fracción de conjugación puede ser un marcador útil para la detección o el diagnóstico. En determinadas realizaciones, la fracción de conjugación está unida al anticuerpo a través de un enlace covalente directo. En determinadas realizaciones, la fracción de conjugación está unida al anticuerpo a través de un enlazador. En realizaciones ventajosas, la fracción de conjugación o el enlazador se acopla a través de uno de los aminoácidos no naturales del anticuerpo. Las fracciones de conjugación y los enlazadores a modo de ejemplo se analizan en las siguientes secciones.

Aminoácidos no naturales

El aminoácido no natural puede ser cualquier aminoácido no natural conocido por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden un grupo funcional. El grupo funcional puede ser cualquier grupo funcional conocido por los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, el grupo funcional es un marcador, un grupo polar, un grupo no polar o un grupo reactivo.

Los grupos reactivos son particularmente ventajosos para unir grupos funcionales adicionales al anticuerpo en la posición de localización específica de la cadena de anticuerpo. En determinadas realizaciones, el grupo reactivo se selecciona del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, azido y alquililo.

En determinadas realizaciones, el resto de aminoácido está de acuerdo con cualquiera de las siguientes fórmulas:



Los expertos en la materia reconocerán que los anticuerpos generalmente están compuestos de L-aminoácidos. Sin embargo, con aminoácidos no naturales, los presentes métodos y composiciones proporcionan al experto la capacidad de utilizar aminoácidos no naturales L, D o racémicos en las posiciones de localización específica. En determinadas realizaciones, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento incluyen versiones D de los aminoácidos naturales y versiones racémicas de los aminoácidos naturales.

En las fórmulas anteriores, las líneas onduladas indican enlaces que conectan con el resto de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos. Estos aminoácidos no naturales pueden incorporarse en las cadenas polipeptídicas del mismo modo que se incorporan los aminoácidos naturales a las mismas cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, los aminoácidos no naturales se incorporan a la cadena polipeptídica a través de enlaces amida, como se indica en las fórmulas.

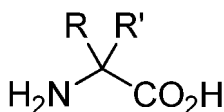
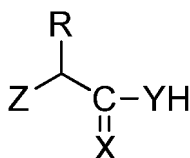
En las fórmulas anteriores, R designa cualquier grupo funcional, sin limitación, siempre que el resto de aminoácido no sea idéntico a un resto de aminoácido natural. En determinadas realizaciones, R puede ser un grupo hidrófobo, un grupo hidrófilo, un grupo polar, un grupo ácido, un grupo básico, un grupo quelante, un grupo reactivo, una fracción terapéutica o una fracción de marcaje. En determinadas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en $R^1NR^2R^3$, $R^1C(=O)R_2$, $R^1C(=O)OR^2$, R^1N_3 , $R^1C\equiv CH$. En estas realizaciones, R_1 se selecciona del grupo que consiste en un enlace, alquileo, heteroalquileo, arileno, heteroarileno. Cada uno de R_2 y R_3 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y heteroalquilo.

En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural incluyen grupos funcionales de cadena lateral que reaccionan de forma eficaz y selectiva con grupos funcionales que no se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, el polipéptido de unión a antígeno que incluye un aminoácido no codificado de forma natural que contiene un grupo funcional azido puede hacerse reaccionar con un polímero (que incluye, pero sin limitación, poli(etilenglicol) o, como alternativa, un segundo polipéptido que contiene un resto alquino para formar un conjugado estable que resultante de la reacción selectiva de la azida y los grupos funcionales alquino para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen.

Los aminoácidos no codificados de forma natural a modo de ejemplo que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención y que son útiles para reacciones con polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, los que tienen grupos reactivos carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquileo. En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden una fracción de sacárido. Los ejemplos

de tales aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos donde la unión en N u O que se produce de forma natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, un alqueno, una 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.

Muchos de los aminoácidos no codificados de forma natural que se proporcionan en el presente documento están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania) o Peptech (Burlington, Mass., EE. UU.). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento o utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Para las técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, Organic Chemistry de Fessenden y Fessenden, (1982, segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry de March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry de Carey y Sundberg (tercera edición, partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Véase, también, las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos 2003/0082575 y 2003/0108885. Además de los aminoácidos no naturales que contienen nuevas cadenas laterales, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras de esqueleto modificadas, incluyendo, pero sin limitación, como ilustran las estructuras de Fórmula II y III:



en donde Z comprende normalmente OH, NH₂, SH, NH-R' o S-R'; X e Y, que pueden ser iguales o distintos, comprenden normalmente S u O, y R y R', que son opcionalmente iguales o distintos, se seleccionan normalmente de la misma lista de constituyentes para el grupo R descrita anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la Fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención comprenden opcionalmente sustituciones en el grupo amino o carboxilo como se ilustra en las Fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero sin limitación, α-hidroxiácidos, α-tioácidos, α-aminotiocarboxilatos, incluyendo, pero sin limitación, con cadenas laterales correspondientes a los veinte aminoácidos naturales comunes o con cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono α incluyen opcionalmente, pero sin limitación, aminoácidos sustituidos en L, D o α-α-disustituidos tales como el D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico y similares. Otras alternativas estructurales incluyen los aminoácidos cíclicos, tales como los análogos de la prolina, así como los análogos de prolina de anillo de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, aminoácidos P e y, tales como β-alanina sustituida y ácido γ-aminobutírico.

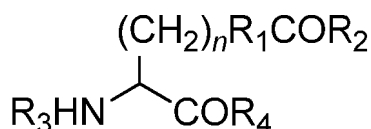
Muchos aminoácidos no naturales están basados en aminoácidos naturales, tales como la tirosina, la glutamina, la fenilalanina, y son adecuados para su uso en la presente invención. Los análogos de tirosina incluyen, pero sin limitación, tirosinas para-sustituidas, tirosinas orto-sustituidas y tirosinas meta sustituidas, donde la tirosina sustituida comprende, incluyendo, pero sin limitación, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un grupo benzoilo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un carbohidrato de C6-C20 de cadena lineal o ramificado, un carbohidrato saturado o insaturado, un grupo O-metilo, un grupo poliéter, un grupo nitro, un grupo alquinilo o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo sustituidos de forma múltiple. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, derivados de α-hidroxiácidos, derivados γ-sustituidos, derivados cíclicos y derivados de glutamina de amida sustituida. Los análogos de fenilalanina a modo de ejemplo que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, fenilalaninas para-sustituidas, fenilalaninas orto-sustituidas y fenilalaninas meta-sustituidas, en donde el sustituyente comprende, incluyendo, pero sin limitación, un grupo hidroxí, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (incluyendo, pero sin limitación, un grupo acetilo), un benzoilo, un grupo alquinilo o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, una p-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAcβ-serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfoserina, una fosfontirosina, una p-yodo-

fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina y una p-propargiloxi-fenilalanina, y similares. Los ejemplos de estructuras de diversos aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención se proporcionan en, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "Incorporación de aminoácidos no naturales *in vivo*". Véase también Kiick *et al.*, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, para análogos de metionina adicionales.

Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma (EE. UU.) o Aldrich (Milwaukee, Wis., EE. UU.). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento o como se proporciona en diversas publicaciones, o utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Para las técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, Organic Chemistry de Fessenden y Fessenden, (1982, segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry de March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry de Carey y Sundberg (tercera edición, partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "Incorporación de aminoácidos no naturales *in vivo*"; Matsoukas *et al.*, (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F. E. y Kidd, D. A. A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O. M. y Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J. C. *et al.* (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. y Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. y Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B. D. y Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 1989:1859-1866; Barton *et al.*, (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron Lett. 43:4297-4308; y, Subasinghe *et al.*, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. Véase también, las solicitudes de patente tituladas "Matrices de proteínas", presentada el 22 de diciembre de 2003, documento US 2004-0198637.

Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten diversas reacciones para unir moléculas (incluyendo, pero sin limitación, PEG u otras moléculas solubles en agua) a través de reacciones de adición nucleófila o condensación aldólica, entre otras.

Los aminoácidos a modo de ejemplo que contienen carbonilo se pueden representar de la siguiente manera:



en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo amino, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo carboxilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción cetona se coloca en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo simple (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción cetona se coloca en la posición meta con respecto a la cadena lateral de alquilo.

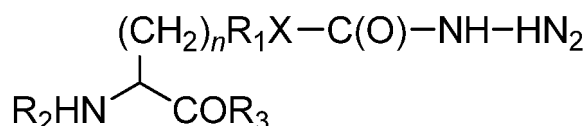
En la presente invención, un aminoácido no codificado de forma natural que porta grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en el polipéptido como una funcionalidad de aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxisisina porta un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído normalmente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es normalmente de alrededor de 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar de aproximadamente 1,5 de meta peryodato 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.º 6.423.685.

La funcionalidad carbonilo se puede hacer reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones suaves en solución acuosa, para formar los enlaces correspondientes de hidrazona, oxima o semicarbazona, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., J. Am.

Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad exclusiva del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. y Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al.*, Science 276:1125-1128 (1997).

5 Los aminoácidos no codificados de forma natural que contienen un grupo nucleófilo, tal como una hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con diversos grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros solubles en agua).

10 Los aminoácidos a modo de ejemplo que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida se pueden representar de la siguiente manera:



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

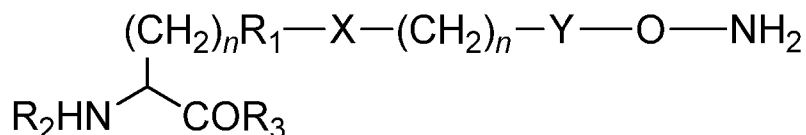
20 En algunas realizaciones, n es 4, R₁ no está presente y X es N. En algunas realizaciones, n es 2, R₁ no está presente y X no está presente. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, y el átomo de oxígeno se coloca en para con respecto el grupo alifático en el anillo de arilo.

25 Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida están disponibles en el mercado. Por ejemplo, L-glutamato-γ-hidrazida está disponible en Sigma Chemical (St. Louis, Mo.). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos no disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 6.281.211.

30 Los polipéptidos que contienen aminoácidos codificados de forma no natural que portan funcionalidades de hidrazida, hidrazina o semicarbazida pueden reaccionar de forma eficaz y selectiva con diversas moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). La reactividad exclusiva de los grupos funcionales hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace significativamente más reactivos frente a los aldehídos, cetonas y otros grupos electrófilos, en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, el grupo hidroxilo de la serina o la treonina, o los grupos amino de la lisina y el extremo N).

35 Los aminoácidos no codificados de forma natural que contienen un grupo aminooxi (también llamado una hidroxilamina) permiten la reacción con diversos grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Como las hidrazinas, las hidrazidas o las semicarbazidas, la nucleofilicidad potenciada del grupo aminooxi les permite reaccionar de forma eficaz y selectiva con diversas moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. 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: 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, una oxima es el resultado, generalmente, de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo, tal como una cetona.

45 Los aminoácidos a modo de ejemplo que contienen grupos aminooxi se pueden representar de la siguiente manera:



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

55 Los aminoácidos que contienen aminooxi pueden prepararse a partir de precursores de aminoácidos fácilmente disponibles (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-

8858 (2003). Determinados aminoácidos que contienen aminoóxido, tales como ácido L-2-amino-4-(aminoóxido)butírico, se han aislado de fuentes naturales (Rosenthal, G. *et al.*, *Life Sci.* 60: 1635-1641 (1997). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos que contienen aminoóxido.

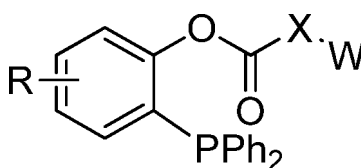
- 5 La reactividad exclusiva de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y de otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente las azidas alifáticas, y los alquinos son generalmente estables frente a las condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto los grupos funcionales azida como los alquinos son inertes frente a las cadenas laterales (es decir, los grupos R) de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en los polipéptidos de origen natural. Cuando se sitúan próximos, sin embargo, la naturaleza "propensa a reaccionar" de los grupos azida y alquino y reaccionan de forma selectiva y eficaz a través de la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin J., *et al.*, *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).
- 10
- 15 Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, por ejemplo, Padwa, A., en *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), pág. 1069-1109; Huisgen, R. en *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), pág. 1-176) en lugar de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural que portan azida y cadenas laterales que contienen alquinos permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido no codificado de forma natural. La reacción de cicloadición que implica azida o un anticuerpo que contiene alquino se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (incluyendo, pero sin limitación, en forma de una cantidad catalítica de CuSO₄) en presencia de un agente reductor, para reducir Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en una cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., *et al.*, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Los agentes reductores a modo de ejemplo incluyen, incluyendo, pero sin limitación, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe²⁺, Co²⁺, y un potencial eléctrico aplicado.
- 20
- 25

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

35 El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un aril éster y funcionalizarse de manera apropiada con una fracción de aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona de forma eficaz con un enlace éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser una alquil azida (incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una aril azida (p-azido-fenilalanina).

40

Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo que contienen un aril éster y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:



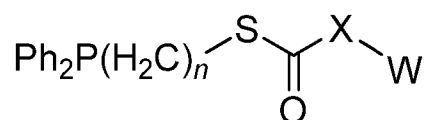
45 en donde X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y grupos arilo sustituidos. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. R', R'', R''' y R'''' se refiere cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente, como que son cada uno grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y 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'R'' se entiende que incluye, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que se entiende que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos que no son grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

50

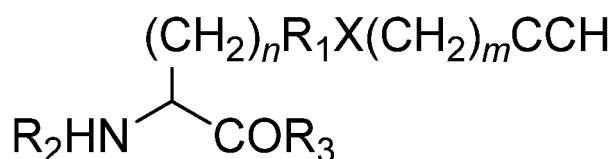
55

60

El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster y funcionalizarse de manera apropiada con una fracción de aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona de forma eficaz con el enlace tioéster para generar la amida correspondiente. Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo que contienen un tioéster y una fracción de fosfina se pueden representar de la siguiente manera:



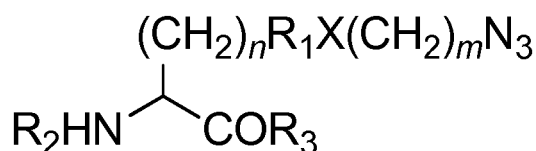
en donde n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, y W es un polímero soluble en agua.
Los aminoácidos a modo de ejemplo que contienen alquino se pueden representar de la siguiente manera:



en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido, o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10, R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo carboxilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción acetileno se coloca en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 1 y el grupo propargiloxi se coloca en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunas realizaciones, n es 1, R₁ y X no están presentes y m es 0 (es decir, proparilglicina).

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la propargilglicina está disponible en el mercado de Peptech (Burlington, Mass). Como alternativa, los aminoácidos que contienen alquino se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, se puede sintetizar p-propargiloxifenilalanina, por ejemplo, como describen Deiters, A., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003) y se puede sintetizar 4-alquini-L-fenilalanina como describen Kayser, B., *et al.*, Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos que contienen alquino.

Los aminoácidos a modo de ejemplo que contienen azida se pueden representar de la siguiente manera:



en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido, arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R₂ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo amino, y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido, o un grupo de modificación del extremo carboxilo. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción azida se coloca en para con respecto a la cadena lateral de alquilo. En algunas realizaciones, n es 0-4 y R₁ y X no están presentes, y m=0. En algunas realizaciones, n es 1, R₁ es fenilo, X es O, m es 2 y la fracción P-azidoetoxi se coloca en la posición para con respecto a la cadena lateral de alquilo.

Los aminoácidos que contienen azida están disponibles en el mercado. Por ejemplo, 4-azidofenilalanina se puede obtener de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, Ill.). Para los aminoácidos que contienen azida que no están disponibles en el mercado, el grupo azida se puede preparar de forma relativamente fácil usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, a través del desplazamiento de un grupo saliente adecuado (incluyendo, pero sin limitación, haluro, mesilato, tosilato) o a través de la apertura de una lactona protegida adecuadamente. Véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry de March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York).

La reactividad exclusiva de los grupos funcionales de aminotiol beta sustituido los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y de otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído a través de la formación de la tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao y J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas realizaciones, pueden incorporarse en los anticuerpos aminoácidos con aminotiol beta sustituido y luego

hacerse reaccionar con polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad aldehído. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua, un conjugado de fármaco u otra carga útil, puede acoplarse a un polipéptido de anticuerpo que comprende un aminoácido con aminotiol beta sustituido a través de la formación de la tiazolidina.

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

15 En realizaciones particulares, los aminoácidos no naturales se seleccionan de p-acetil-fenilalanina, p-etinil-fenilalanina, p-propargiloxifenilalanina, y p-azido-fenilalanina. Un aminoácido no natural particularmente útil es la p-azido fenilalanina. Los expertos en la materia saben que este resto de aminoácido facilita las reacciones de cicloadición [3 +2] de Huisgen (las denominadas reacciones químicas de "encaje") con, por ejemplo, compuestos que portan grupos alquínulo. Esta reacción permite a un experto en la materia conjugar fácil y rápidamente al anticuerpo en la posición de localización específica del aminoácido no natural.

20 En determinadas realizaciones, el primer grupo reactivo es una fracción alquínulo (incluyendo, pero sin limitación, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina, en que el grupo propargilo también se denomina en ocasiones una fracción acetileno) y el segundo grupo reactivo es una fracción azido, y se puede usar la cicloadición química [3+2]. En determinadas realizaciones, el primer grupo reactivo es la fracción azido (incluyendo, pero sin limitación, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquínulo.

30 En las fórmulas anteriores, cada L representa un enlazador divalente. El enlazador divalente puede ser cualquier enlazador divalente conocido por los expertos en la materia. En general, el enlazador divalente tiene la capacidad de formar enlaces covalentes con la fracción funcional R y al carbono alfa del aminoácido no natural. Los enlazadores divalentes útiles son un enlace, alquilenilo, alquilenilo sustituido, heteroalquilenilo, heteroalquilenilo sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido. En determinadas realizaciones, L es alquilenilo C₁₋₁₀ o heteroalquilenilo C₁₋₁₀.

35 Los aminoácidos no naturales utilizados en los métodos y composiciones descritos en el presente 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 con respecto 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 con respecto a la reactividad química de los aminoácidos de origen natural presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes desde el punto de vista químico hacia los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de manera estable en un polipéptido, preferentemente con la estabilidad proporcional a los aminoácidos de origen natural o en condiciones fisiológicas típicas, y 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, preferentemente en condiciones que no destruyen las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el aminoácido no natural (a menos que, por supuesto, tal destrucción de las propiedades biológicas sea el fin de la modificación/transformación), o cuando la transformación puede producirse en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o cuando el sitio reactivo en el aminoácido no natural es un sitio electrófilo. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes, de aminoácidos que satisfacen estas cuatro propiedades para aminoácidos no naturales que pueden usarse con las composiciones y métodos descritos en el presente documento se presentan en las FIG. 2, 3, 35 y 40-43. 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 el desenmascaramiento del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que se pueden transformar en un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección del grupo protegido o del desenmascaramiento del grupo enmascarado y, de este modo, están disponibles para reaccionar con las hidroxilaminas u oximas para formar grupos de oxima.

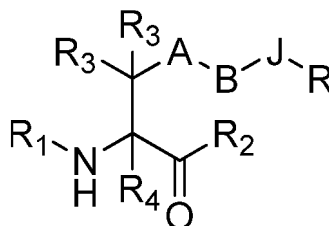
60 En realizaciones adicionales, los aminoácidos no naturales que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aminoácidos que comprenden un reticulador fotoactivable, aminoácidos marcados con espín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radioactivos, aminoácidos con grupos funcionales nuevos, aminoácidos que interactúan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoconfinados y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados tales

como una serina sustituida por un azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituido con un átomo pesado, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con una cadena lateral alargada en comparación con los aminoácidos naturales, incluyendo, pero sin limitación, poliéteres o carbohidratos de cadena larga, incluyendo, pero sin limitación, mayores que aproximadamente 5 o mayores que aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen un azúcares unidos a carbonos, aminoácidos redox activos, aminoácidos que contienen aminotioácido y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

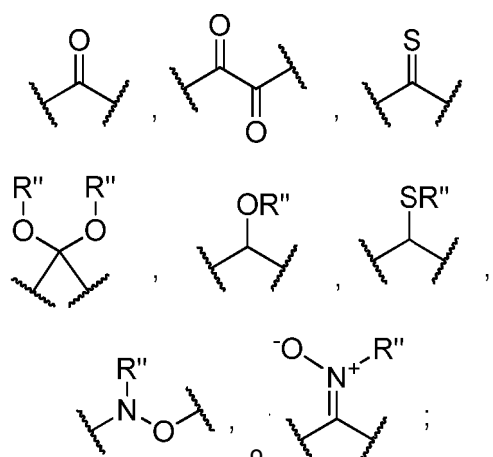
En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales comprenden una fracción de sacárido. Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos donde la unión en N u O que se produce de forma natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluyendo, pero sin limitación, un alqueno, una 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.

Las fracciones químicas incorporadas en los anticuerpos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales ofrecen diversas ventajas y manipulaciones de los polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad exclusiva de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de anticuerpos con cualquiera de una serie de reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vivo e in vitro*. Un aminoácido no natural con un átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para organizar datos de estructura por rayos X. La introducción de localización específica de los átomos pesados utilizando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluyendo, pero sin limitación, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluyendo, pero sin limitación, fenilazida)), por ejemplo, permiten una fotorreticulación eficaz de polipéptidos *in vivo e in vitro*. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero sin limitación, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenolalanina. Los anticuerpos con los aminoácidos no naturales fotorreactivos pueden entonces reticularse a voluntad mediante la excitación del grupo fotorreactivo, lo que proporciona un control temporal. En un ejemplo no limitante, el grupo metilo de un amino no natural se puede sustituir por uno marcado isotópicamente, incluyendo, pero sin limitación, por un grupo metilo, como una sonda de la estructura y dinámica locales, incluyendo, pero sin limitación, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten diversas reacciones para unir moléculas a través de diversas reacciones químicas, incluyendo, pero sin limitación, reacciones de adición nucleófila. Dichos grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo ceto o aldehído), un grupo similar a carbonilo o similar a dicarbonilo (que tiene 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 se puede convertir fácilmente en un grupo carbonilo o dicarbonilo), o un grupo carbonilo protegido o dicarbonilo protegido (que tiene reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (I):



en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior 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)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; J es



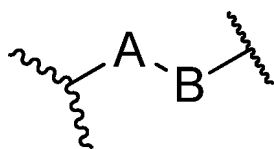
5

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R^{''} es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando está presente más de un grupo R^{''}, dos R^{''} forman opcionalmente un heterocicloalquilo; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; o los grupos -A-B-J-R forman juntos un heterocicloalquilo o un cicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, incluyendo un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado; o el grupo -J-R forma un heterocicloalquilo o un cicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado; con la condición de que cuando A es fenileno y cada R₃ es H, B está presente; y que cuando A es -(CH₂)₄- y cada R₃ es H, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y que cuando A y B están ausentes y cada R₃ es H, R no es metilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

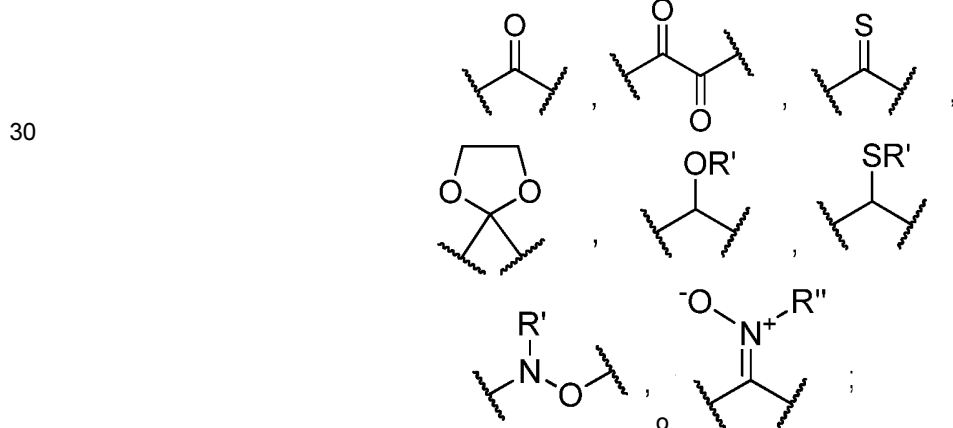
En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas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

En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), B es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, -O- (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)(alquileno o alquileno sustituido)-, o -S(O)₂(alquileno o alquileno sustituido)-. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), B es -O(CH₂)-, -CH=N-, -CH=N-NH-, -NHCH₂-, -NHCO-, -C(O)-, -C(O)-(CH₂)-, -CONH-(CH₂)-, -SCH₂-, -S(=O)CH₂- o -S(O)₂CH₂-. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R es cicloalquilo o alquilo C1-6. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₁ es H, *tert*-butiloxicarbonilo (Boc), 9-Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o benciloxicarbonilo (Cbz). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo u O-*t*-butilo. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es un polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es un ácido ribonucleico (ARN). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es ARNt. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), el ARNt reconoce de forma específica un codón selector. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I) el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón exclusivo, un codón raro, un codón no natural, un codón de cuatro bases y un codón de cinco bases. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), R₂ es un ARNt supresor.

En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (I),



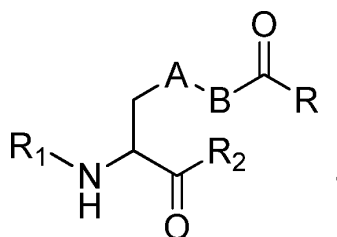
se selecciona del grupo que consiste en: (i) A es alquileno inferior sustituido, arileno C4, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido; B es
 5 opcional, y cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; (ii) A es opcional, y cuando está presente es un alquileno inferior sustituido, arileno C4, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido; B es un enlazador divalente
 15 seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; (iii) A es un alquileno inferior; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido,
 20 alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; y (iv) A es fenileno; B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R'), -S(O)₂N(R'), -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-; J es



35 cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R₁ es opcional, y cuando está presente, es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es opcional, y cuando está presente, es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido; y R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

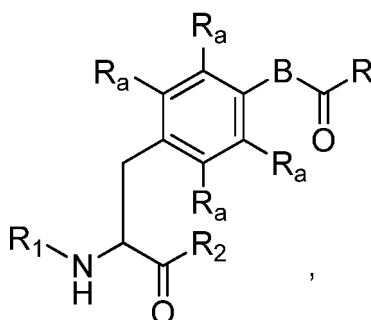
Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (II):

40



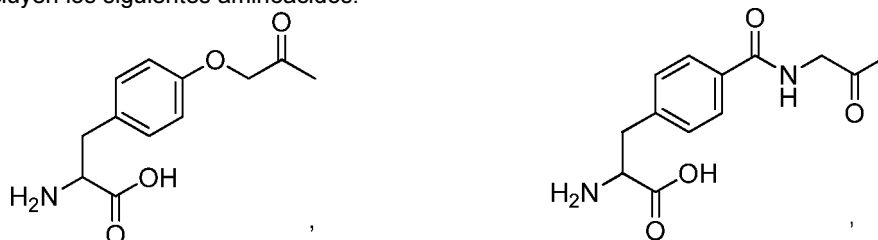
en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones, cuando A es fenileno, B está presente; y que cuando A es -(CH₂)₄-, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

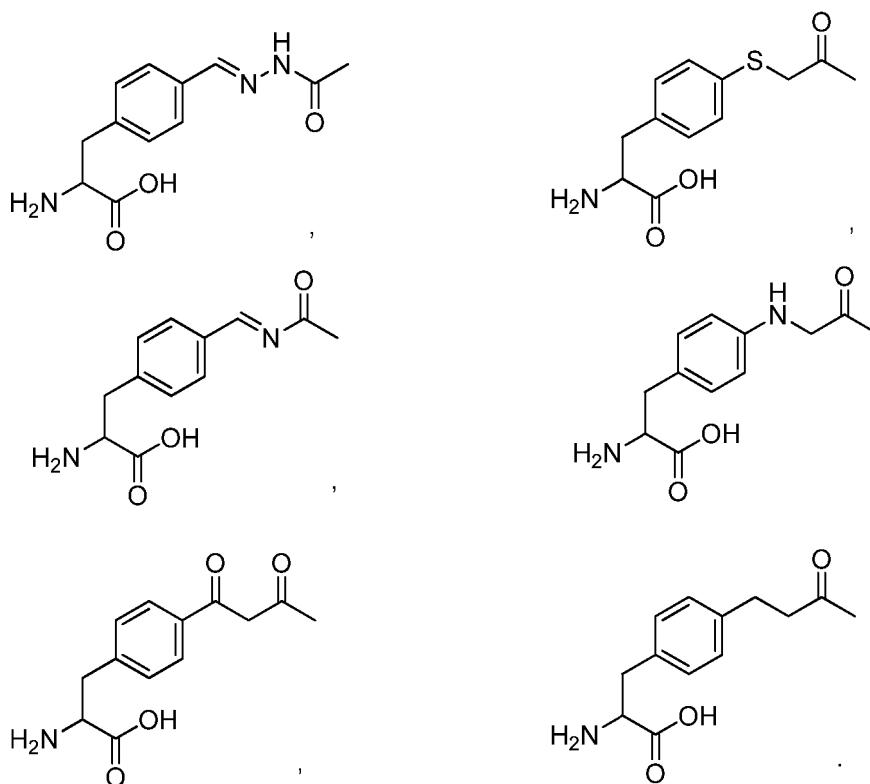
Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (III):



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)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

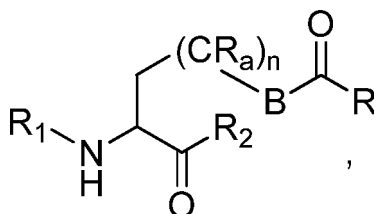




y

5 Dichos aminoácidos no naturales pueden tener, opcionalmente, un grupo amino protegido, carboxilo protegido y/o estar en forma de una sal, o pueden estar incorporados en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

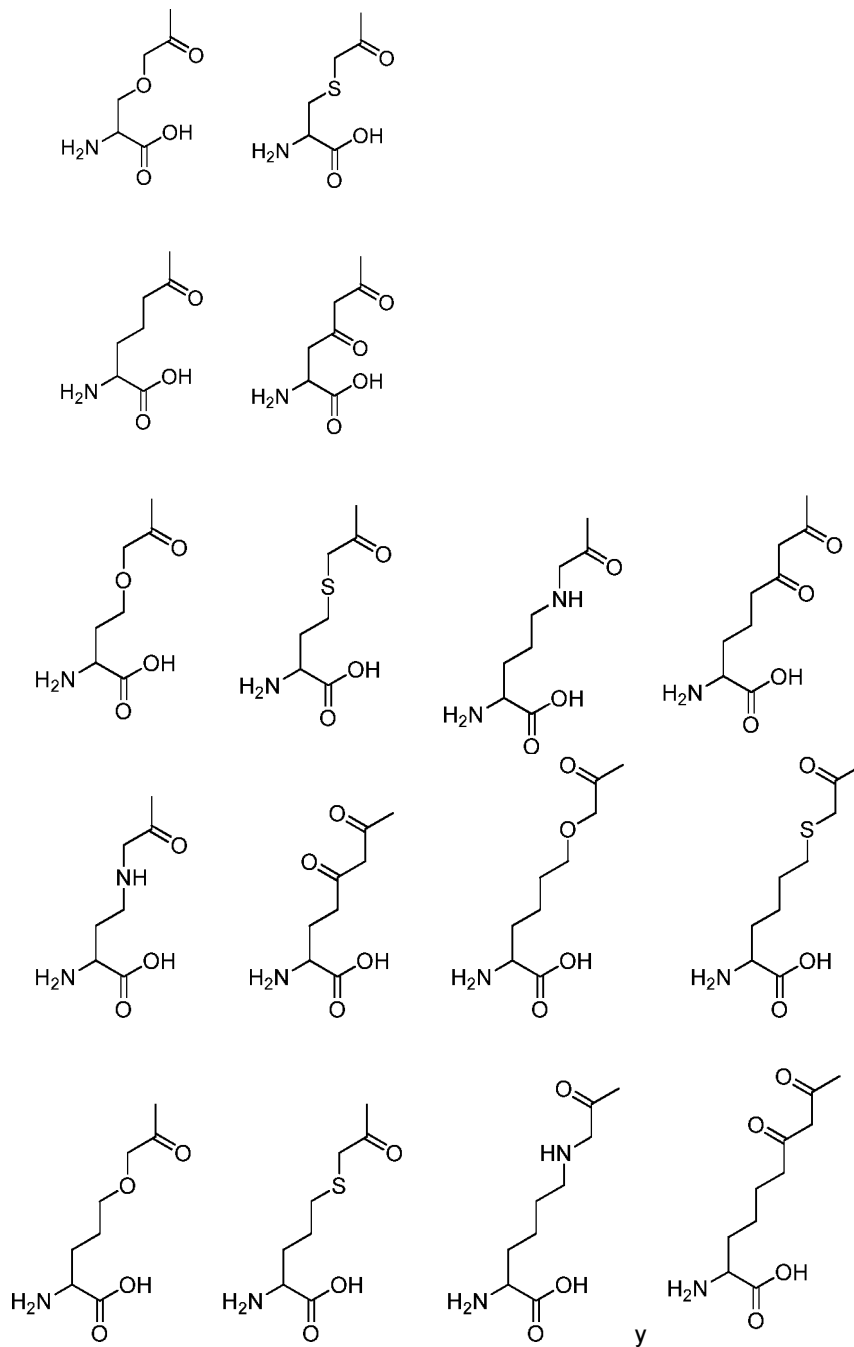
10 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IV):



15 en donde -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8. En determinadas realizaciones, cuando A es -(CH₂)₄-, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

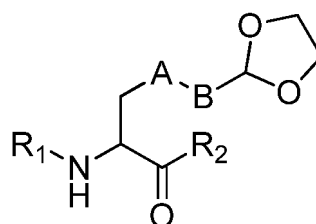
30

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



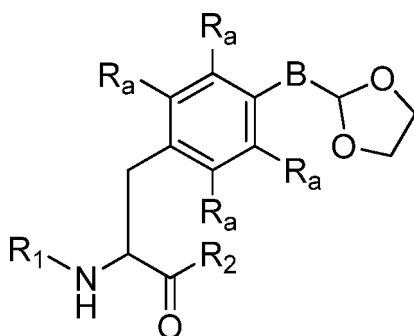
5 en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos, opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de los mismos, o pueden estar incorporados en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



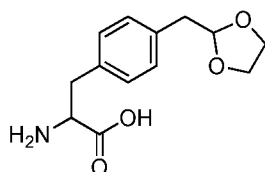
en donde, A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

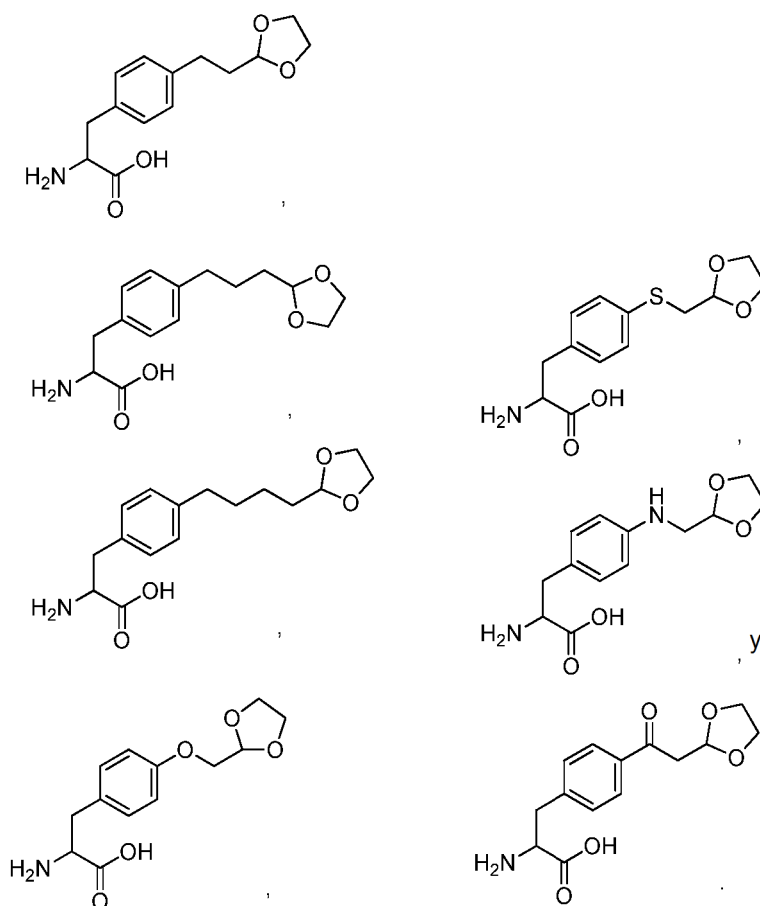
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (IX):



en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; en donde cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

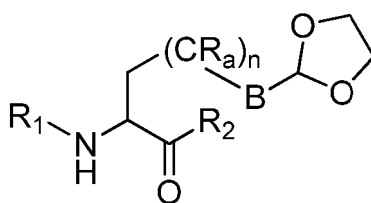
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:





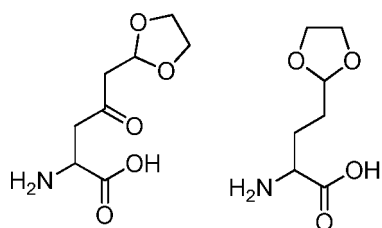
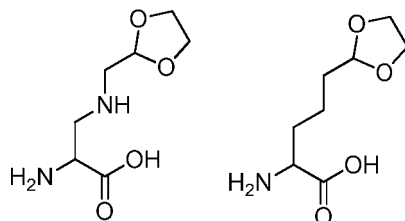
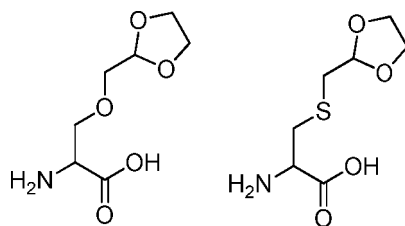
5 en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos, opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de los mismos, o pueden estar incorporados en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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

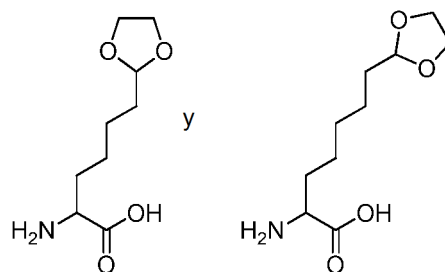


15 en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

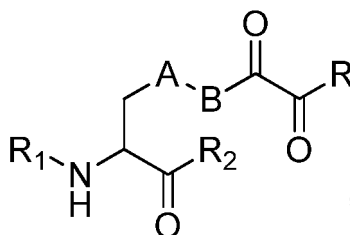


5



10 en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos, opcionalmente carboxilo protegidos, opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de los mismos, o pueden estar incorporados en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

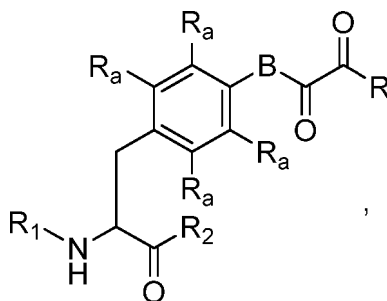
15 Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, similares a dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos de dicarbonilo protegido. Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (V):



20 en donde, A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior

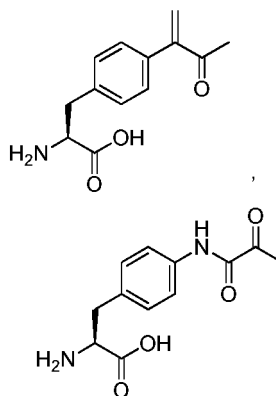
sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



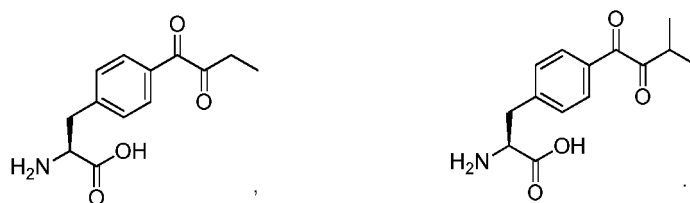
en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; en donde cada R_a selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



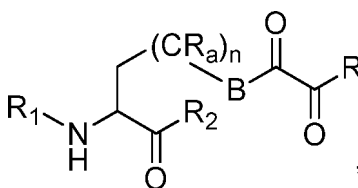
40

y



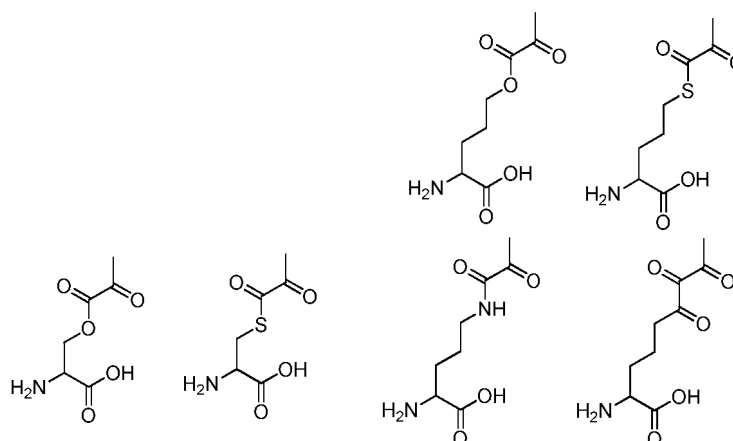
5 en donde tales compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de los mismos. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

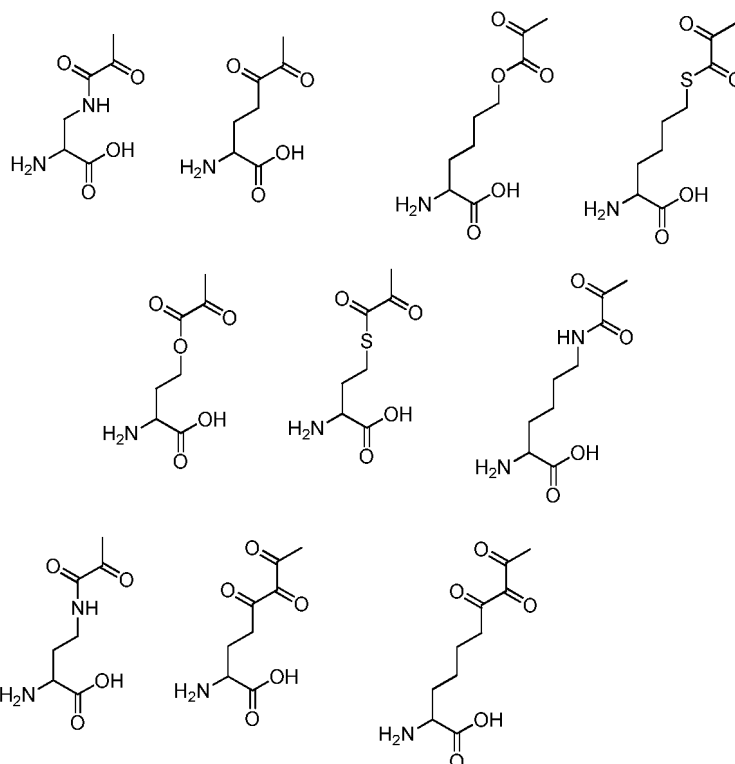
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



10 en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



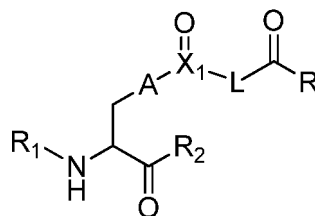


y

5

en donde los compuestos están opcionalmente amino protegidos y carboxilo protegidos, o una sal de los mismos, o pueden estar incorporados en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

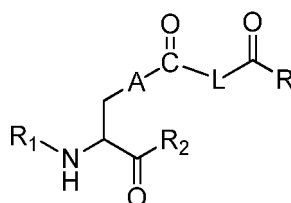
10 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXX):



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

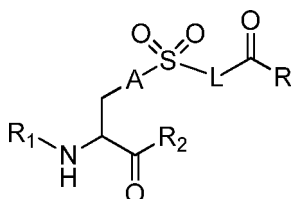
25

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



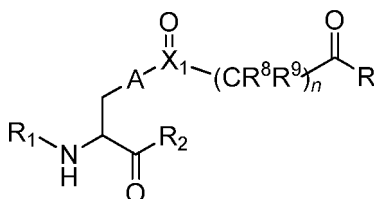
en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; L es 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



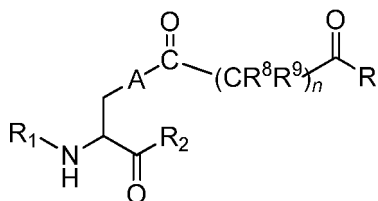
en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; L es 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; X₁ es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada uno de R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

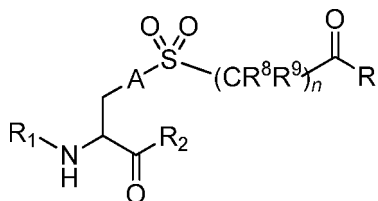
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXI-A):



5 en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada uno de R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se
10 selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

15

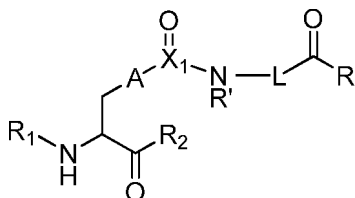
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXI-B):



20 en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada uno de R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se
25 selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

30

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

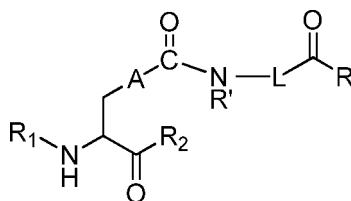


35

en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; X₁ es C, S o S(O); y L es 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse
40
45

postraduccionalmente.

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

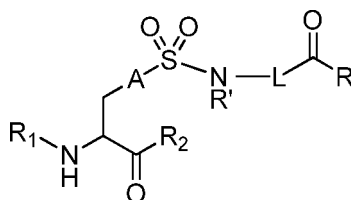


5

en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; L es 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

20

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



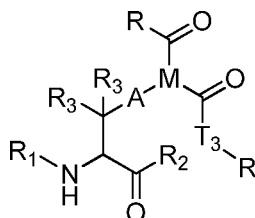
25

30

en donde: A es opcional, y cuando está presente es un 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; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; L es 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

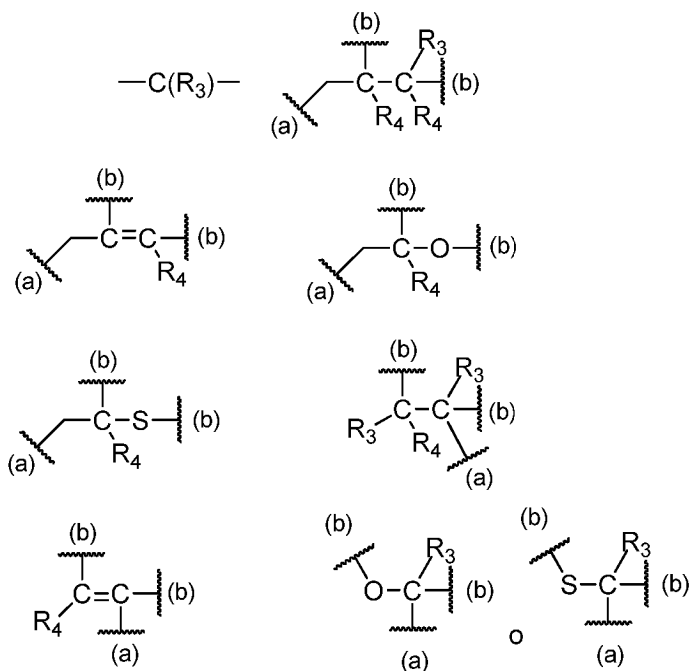
35

Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXX):



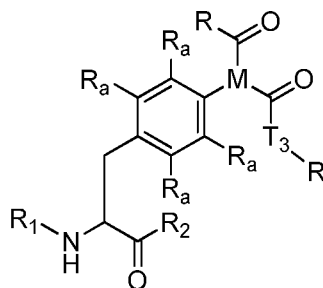
40

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

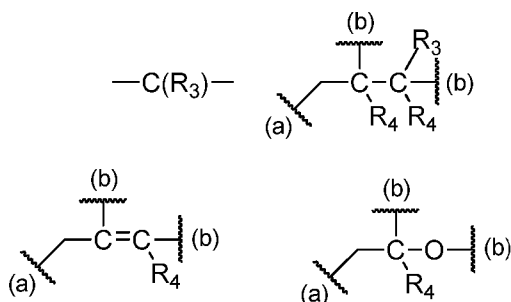


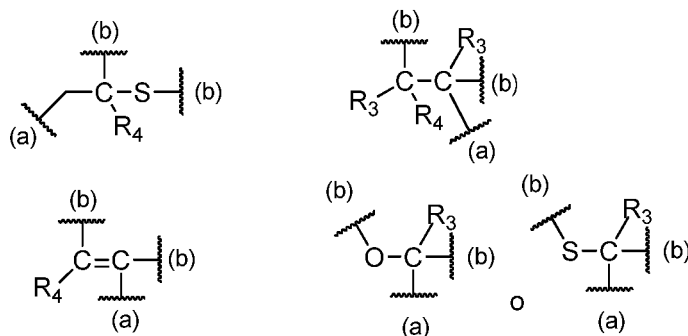
5 donde (a) indica el enlace al grupo A y (b) indica el enlace a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ se escogen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T₃ es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

15 Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXI):



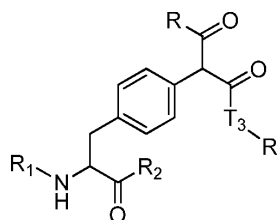
20 en donde:





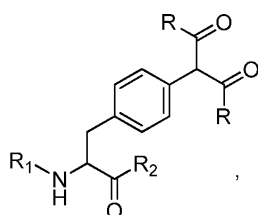
5 donde (a) indica el enlace al grupo A y (b) indica el enlace a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ se escogen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ o dos grupos R₄ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T₃ es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

15 Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXII):



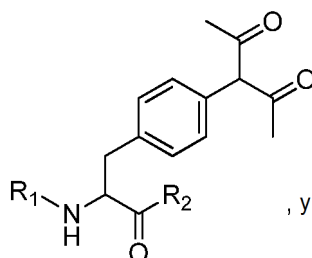
20 en donde: R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y T₃ es O o S. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

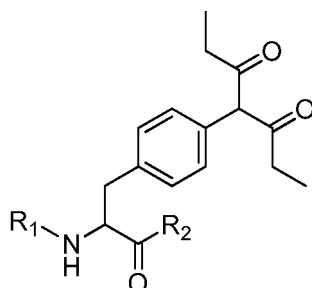
25 Además, están incluidos los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIII):



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

30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen las estructuras de Fórmula (XXXIII):

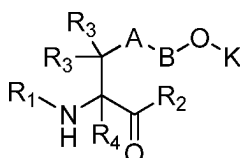




Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Los aminoácidos no naturales que contienen un grupo hidroxilamina (también llamado un aminooxi) permiten la reacción con diversos grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero sin limitación, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Como las hidrazinas, las hidrazidas o las semicarbazidas, la nucleofilicidad potenciada del grupo aminooxi les permite reaccionar de forma eficaz y selectiva con diversas moléculas que contienen grupos carbonilo o dicarbonilo, incluyendo, pero sin limitación, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. 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 es el resultado, generalmente, de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo o dicarbonilo, tal como, a modo de ejemplo, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones descritas en el presente documento hay aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprenden un grupo hidroxilamina, un grupo similar a hidroxilamina (que tiene reactividad similar a un grupo hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo hidroxilamina), o un grupo hidroxilamina protegido (que tiene reactividad similar a un grupo hidroxilamina tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV):



en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; K es -NR₆R₇ o -N=CR₆R₇; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)₂R'', -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₆ y R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un

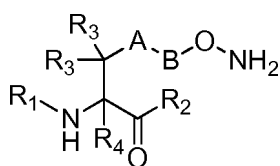
ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminoácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), A es fenileno o fenileno sustituido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), B es -(alquileo o alquileo sustituido)-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)- o -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), B es -O(CH₂)₂-, -S(CH₂)₂-, -NH(CH₂)₂-, -CO(CH₂)₂- o -(CH₂)_n-, donde n es 1 a 4. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₁ es H, *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), 9-Fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o benciloxycarbonilo (Cbz). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), en donde R₂ es OH, O-metilo, O-etilo u O-*t*-butilo. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₂ es un ácido ribonucleico (ARN). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₂ es ARNt. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), el ARNt reconoce específicamente un codón seleccionado del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón exclusivo, un codón raro, un codón no natural, un codón de cuatro bases y un codón de cinco bases. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), R₂ es un ARNt supresor. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, metilo, fenilo y -[(alquileo o alquileo sustituido)-O-(hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido)]_x, en donde x es de 1-50. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), K es -NR₆R₇.

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

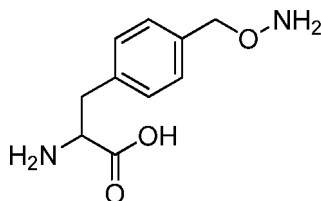
En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XIV) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XIV) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas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

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



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

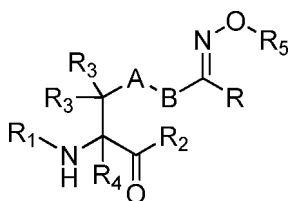
Un aminoácido representativo, pero sin limitación, tiene la siguiente estructura:



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

Los aminoácidos no naturales que contienen un grupo oxima permiten la reacción con diversos reactivos que contienen determinados grupos carbonilo o dicarbonilo reactivos (incluyendo, pero sin limitación, cetonas, aldehídos u otros grupos con reactividad similar) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Dicha reacción de intercambio de oxima permite la funcionalización adicional de polipéptidos de aminoácidos no naturales. Adicionalmente, los aminoácidos no naturales originales que contienen un grupo oxima pueden ser útiles ellos mismos siempre que el enlace de oxima sea estable en las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, los métodos de síntesis *in vivo*, *in vitro* y químicos descritos en el presente documento).

Por lo tanto, en determinadas realizaciones descritas en el presente documento hay aminoácidos no naturales con cadenas laterales que comprenden un grupo oxima, un grupo similar a oxima (que tiene reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo oxima enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo oxima), o un grupo oxima protegido (que tiene reactividad similar a un grupo oxima tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XI):



en donde A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno,

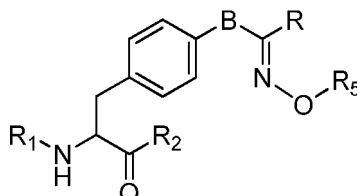
heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)SR'', -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'' o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, (alquileo o alquileo sustituido)-O-N=CR'-, (alquileo o alquileo sustituido)-C(O)NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S(O)_k-(alquileo o alquileo sustituido)-S-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; con la condición de 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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), B es -O-(alquileo o alquileo sustituido)-. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), B es -O(CH₂)-. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R es alquilo C₁₋₄. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R es -CH₃. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₁ es H, *tert*-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o benciloxicarbonilo (Cbz). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo u O-*t*-butilo. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es un polinucleótido. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es un ácido ribonucleico (ARN). En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es ARN_t. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), el ARN_t reconoce de forma específica un codón selector. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón exclusivo, un codón raro, un codón no natural, un codón de cuatro bases y un codón de cinco bases. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₂ es un ARN_t supresor. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₅ es alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido o -C(O)₂R''. En determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₅ es -[(alquileo o alquileo sustituido)-O-(hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido)]_x, en donde x es de 1-50. En

determinadas realizaciones de compuestos de Fórmula (XI), R₅ es -(CH₂CH₂)-O-CH₃ o -COOH.

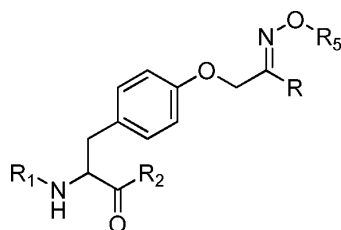
En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XI) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XI) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XI) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En determinadas realizaciones, tales condiciones ácidas son de un pH 2 a 8.

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



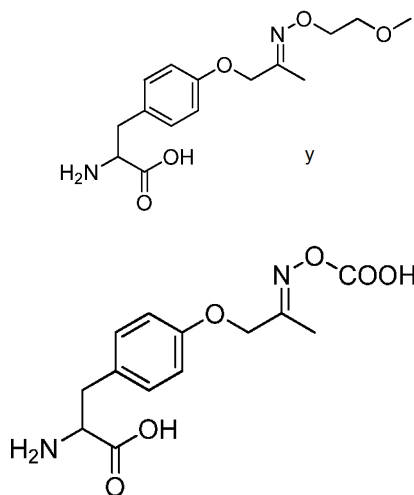
en donde, B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)SR'', -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'' o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotoreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, (alquileo o alquileo sustituido)-O-N=CR'-, (alquileo o alquileo sustituido)-C(O)NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S(O)_k-(alquileo o alquileo sustituido)-S-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, y -C(R')₂-N(R')-N(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 de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIII):



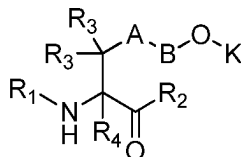
en donde, R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; R₅ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alquilalcoxi, alquilalcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, -(alquileo o alquileo sustituido)-ON(R'')₂, -(alquileo o alquileo sustituido)-C(O)SR'', -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-(arilo o arilo sustituido), -C(O)R'', -C(O)₂R'' o -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₅ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espin; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, (alquileo o alquileo sustituido)-O-N=CR', (alquileo o alquileo sustituido)-C(O)NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S(O)_k-(alquileo o alquileo sustituido)-S-, -(alquileo o alquileo sustituido)-S-S-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



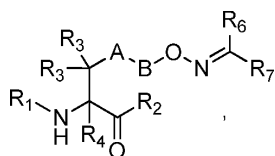
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

5 Además, dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV):



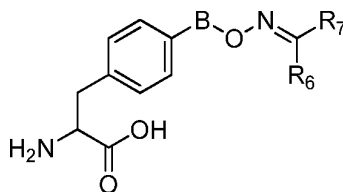
10 en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; K es -NR₆R₇ o -N=CR₆R₇; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, -C(O)R'', -C(O)₂R'', -C(O)N(R'')₂, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquenileno, alquenileno sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

55 Dichos aminoácidos incluyen adicionalmente aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVI):



en donde: A es opcional, y cuando está presente es un alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno 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, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquienilo, alquienilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, -C(O)R", -C(O)₂R", -C(O)N(R")₂, en donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquienilo, alquienilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

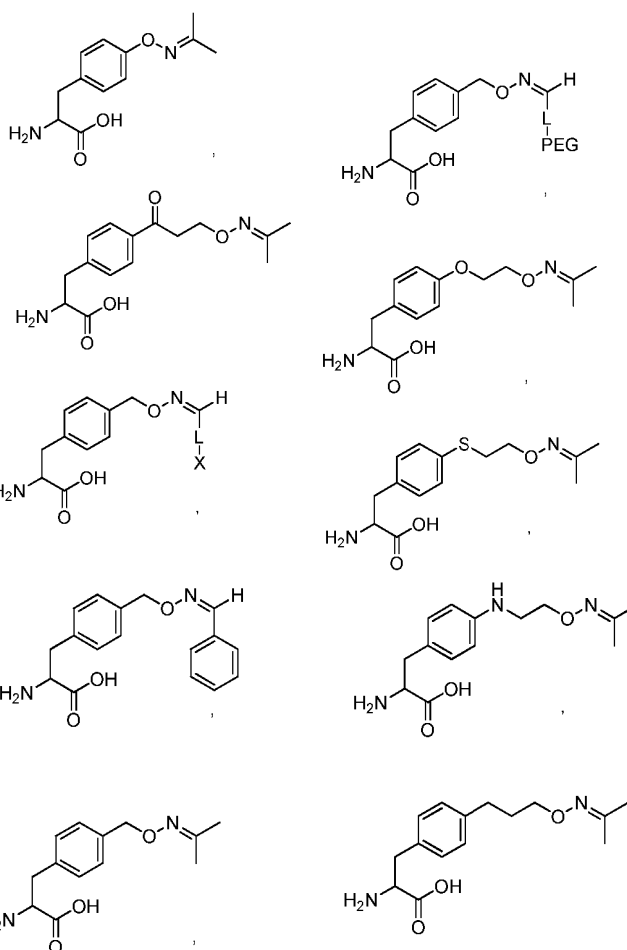
Adicionalmente, dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVII):



en donde: B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

cada uno de R_6 y R_7 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialqueno, óxido de polialqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, $-C(O)R''$, $-C(O)_2R''$, $-C(O)N(R'')_2$, en donde cada R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R_6 o R_7 es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlace seleccionado del grupo que consiste en alqueno, alqueno sustituido, alqueno, alqueno sustituido, $-O-$, $-O-$ (alqueno o alqueno sustituido)-, $-S-$, $-S-$ (alqueno o alqueno sustituido)-, $-S(O)_k-$ donde k es 1, 2 o 3, $-S(O)_k$ (alqueno o alqueno sustituido)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (alqueno o alqueno sustituido)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (alqueno o alqueno sustituido)-, $-N(R')-$, $-NR'-(alqueno o alqueno sustituido)-$, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-(alqueno o alqueno sustituido)-$, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-(alqueno o alqueno sustituido)-$, $-N(R')CO-(alqueno o alqueno sustituido)-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

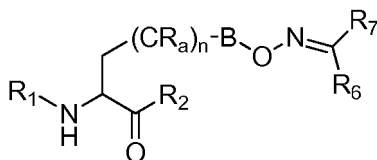
Los ejemplos no limitantes de tales aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen las siguientes estructuras:



y

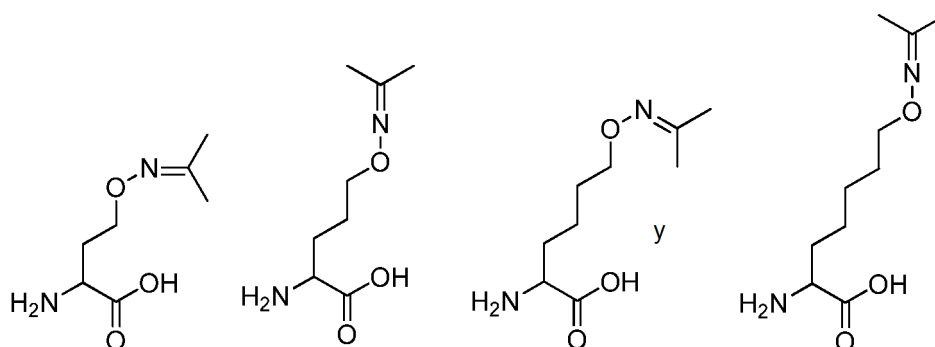
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

5 Adicionalmente, dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVIII):



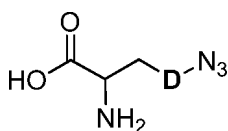
10 en donde: B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R₁ es H, un grupo protector amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada uno de R₆ y R₇ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, óxido de polialquileo, óxido de polialquileo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo y aralquilo sustituido, -C(O)R", -C(O)₂R", -C(O)N(R")₂, en donde cada R" es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, alcarilo, alcarilo sustituido, aralquilo o aralquilo sustituido; o R₆ o R₇ es L-X, donde X se selecciona del grupo que consiste en un marcador; un colorante; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotorreticulante; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metales; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo, una fracción que contiene un metal; una fracción radiactiva; un grupo funcional nuevo; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; una fracción fotoconfinada; una fracción fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; una fracción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unida a carbono; un agente redox activo; un aminotioácido; una fracción tóxica; una fracción marcada isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso en electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; y cualquier combinación de los mismos; y L es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo, alquileo sustituido, alquilenilo, alquilenilo sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR'; donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido, y n es 0 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

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



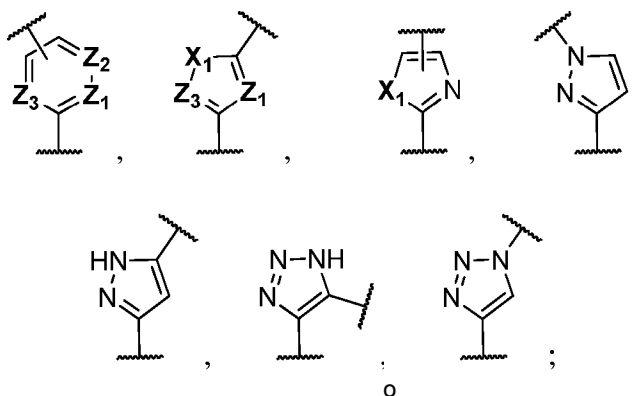
5 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácidos no naturales, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, modificarse postraduccionalmente.

En determinadas realizaciones, el aminoácido no natural puede ser de acuerdo con la fórmula XIX:



10 Fórmula XIX;

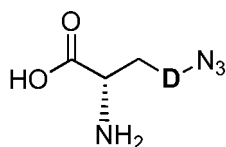
o una sal de las misma, en donde: D es $-\text{Ar}-\text{W}_3-$ o $-\text{W}_1-\text{Y}_1-\text{C}(\text{O})-\text{Y}_2-\text{W}_2-$; Ar es



15

20

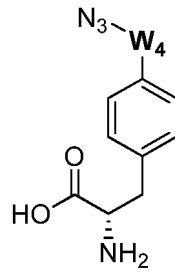
cada uno es W_1 , W_2 , y W_3 es independientemente un enlace sencillo o un alqueno inferior; cada X_1 es independientemente $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ o $-\text{S}-$; cada Y_1 es independientemente un enlace sencillo, $-\text{NH}-$ o $-\text{O}-$; cada Y_2 es independientemente un enlace sencillo, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$ o un pirrolidinileno unido en N o unido en C; y uno de Z_1 , Z_2 , y Z_3 es $-\text{N}-$ y los otros de Z_1 , Z_2 , y Z_3 son independientemente $-\text{CH}-$. En determinadas realizaciones, el aminoácido no natural está de acuerdo con la fórmula XIXa:



25

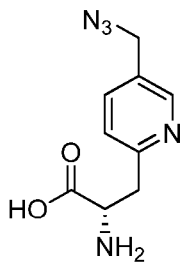
Fórmula XIXa;

donde D se define en el contexto de la fórmula XIX. En determinadas realizaciones, el aminoácido no natural es de acuerdo con la fórmula XIXb:

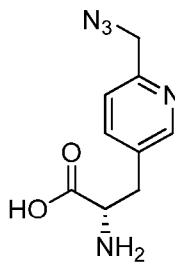


Fórmula XIXb;

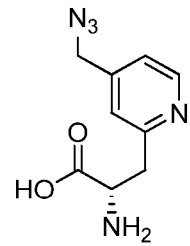
5 o una sal de las misma, en donde **W₄** es alqueno C₁-C₁₀. En una realización adicional, **W₄** es alqueno C₁-C₅. En una realización, **W₄** es alqueno C₁-C₃. En una realización, **W₄** es alqueno C₁. En realizaciones particulares, el aminoácido no natural se selecciona del grupo que consiste en:



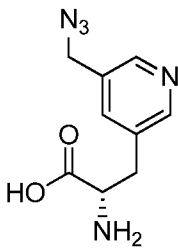
(1)



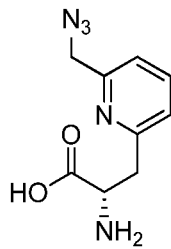
(2)



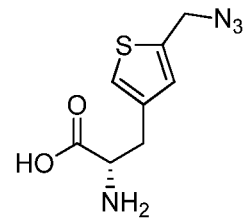
(3)



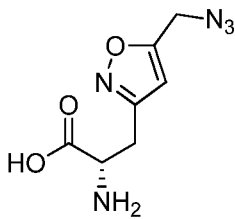
(4)



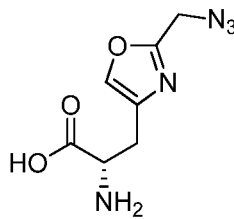
(5)



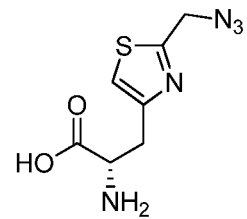
(6)



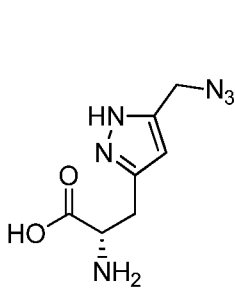
(7)



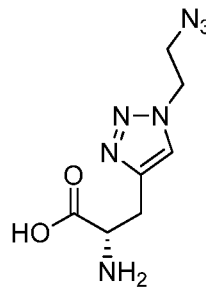
(8)



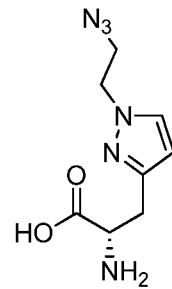
(9)



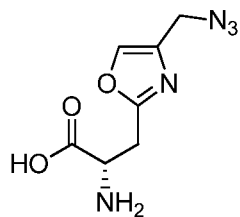
(10)



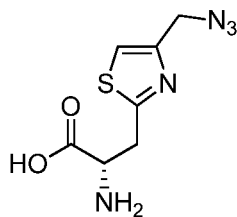
(11)



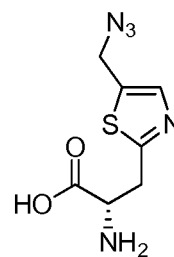
(12)



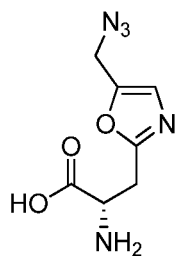
(13)



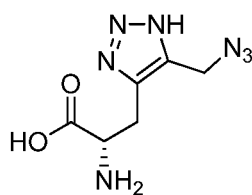
(14)



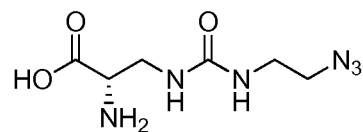
(15)



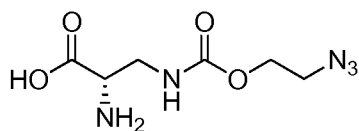
(16)



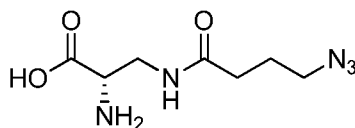
(17)



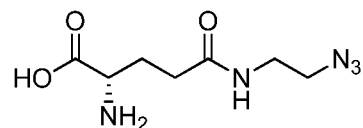
(18)



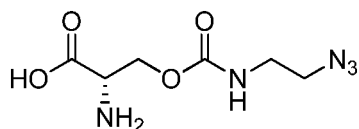
(19)



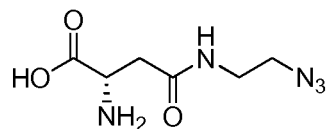
(20)



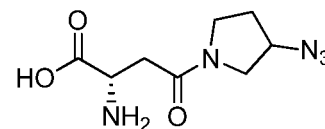
(21)



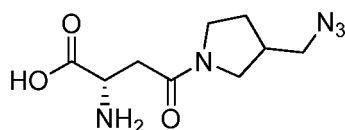
(22)



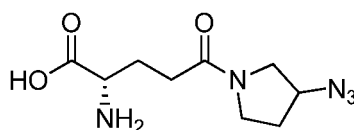
(23)



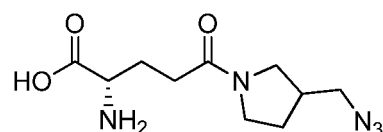
(24)



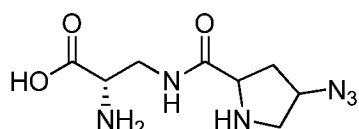
(25)



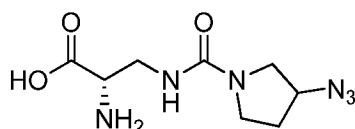
(26)



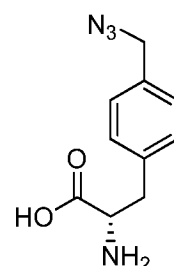
(27)



(28)

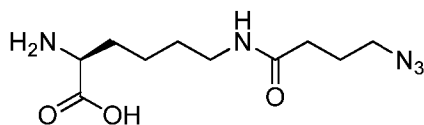


(29)



(30);

y



(40);

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

Enlazadores y cargas útiles

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende un aminoácido no natural que tiene un grupo reactivo, como se describe anteriormente. Un experto en la materia puede usar el grupo reactivo para unir el anticuerpo a cualquier entidad molecular que tenga la capacidad de formar un enlace covalente con el aminoácido no natural, directa o indirectamente a través de un enlazador.

Los enlazadores útiles incluyen los descritos en la sección anterior. En determinadas realizaciones, el enlazador divalente es cualquier enlazador divalente o multivalente conocido por los expertos en la materia. En general, el enlazador tiene la capacidad de formar enlaces covalentes con la fracción funcional R y al carbono alfa del aminoácido no natural. Los enlazadores divalentes útiles son un enlace, alquileno, alquileno sustituido, heteroalquileno, heteroalquileno sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido. En determinadas realizaciones, el enlazador es alquileno C₁₋₁₀ o heteroalquileno C₁₋₁₀.

La carga útil molecular puede ser cualquier entidad molecular que un experto en la materia pueda desear conjugar con el anticuerpo. En determinadas realizaciones, la carga molecular es una fracción terapéutica. En tal realización, el conjugado de anticuerpo se puede usar para dirigir la fracción terapéutica a su diana molecular. En determinadas realizaciones, la carga molecular es una fracción de marcaje. En tales realizaciones, el conjugado de anticuerpo se puede usar para detectar la unión del anticuerpo a su diana. En determinadas realizaciones, la carga molecular es una fracción citotóxica. En tales realizaciones, el conjugado se puede usar para dirigir la fracción citotóxica a una célula patológica, por ejemplo, una célula cancerosa, para iniciar la destrucción o eliminación de la célula. Los conjugados que comprenden otras cargas útiles moleculares evidentes para los expertos en la materia están dentro del alcance de los conjugados descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, un conjugado puede tener una carga útil seleccionada del grupo que consiste en un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, polietilenglicol, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulante, un compuesto citotóxico, un radionúclido, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una proteína o polipéptido o segundo análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metales, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un péptido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido nucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene un metal, una fracción radiactiva, un grupo funcional nuevo, un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas, una fracción fotoconfinada, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unida a carbono, un agente redox activo, un aminotioácido, una fracción tóxica, una fracción marcada isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo denso en electrones, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos.

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

Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, caliqueamicina, derivados de caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina,

ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomomicina), daunorrubicina, dacarbazina, DM1, DM4, docetaxel, doxorubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxíurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbizina, rizoxina, estreptoizotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

En algunas realizaciones, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, ligantes del surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropinas, un compuesto CBI; véase, también, la patente de Estados Unidos N.º 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, discodermólida, eleuterobina y mitoxantrona.

En algunas realizaciones, la carga útil es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de la bacatina, análogos de taxano, epotilonas (por ejemplo, epotilonas A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermólido y eleuterobina.

En determinadas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide puede ser maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:127-131).

En algunas realizaciones, la carga útil es una auristatina, tal como auristatina E o un derivado de la misma. Por ejemplo, el derivado de auristatina E puede ser un éster formado entre auristatina E y un cetóico. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de los derivados de auristatina se describen en las publicaciones de solicitudes de patentes de Estados Unidos n.º 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; la publicación de patente internacional n.º WO 04/010957, la publicación de patente internacional n.º WO 02/088172 y las patentes de Estados Unidos n.º 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En algunas realizaciones, la carga útil no es un radioisótopo. En algunas realizaciones, la carga útil no es radioactiva.

En algunas realizaciones, la carga útil es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azatioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, arabinósido de citosina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

En otras realizaciones, la carga útil es tacrolimus, ciclosporina, FU506 o rapamicina. En realizaciones adicionales, el fármaco es aldesleucina, alemtuzumab, alitreinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbeopetina alfa, denileucina difitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG), goselerina, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, Interferón alfa-2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprevecina, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromano, plicamicina, porfímero de sodio, procarbizina, quinacrina, rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, trastuzumab (HERCEPTIN), tretinoína, mostaza de uracilo, valubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina o zoledronato.

En algunas realizaciones, la carga útil de fármaco es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo o metotrexato. Como alternativa, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de la 5-lipoxigenasa y antagonistas de los receptores del leucotrieno.

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

5 Los inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores redox (por ejemplo, derivados de catecol butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalen, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y derivados de los mismos, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinametoxifenilacéticos sustituidos por radicales cicloalquilo), y precursores de inhibidores redox.

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

20 Aún otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosahexaenoico, y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxi-eicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfiere con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo,
25 fuscósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalen, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromilo, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

Los antagonistas de los receptores de leucotrieno incluyen calcitriol, ontazolast, Bay-x-1005 de Bayer, CGS-25019C
30 de Ciba-Geigy, ebselen, ETH-615 de Leo Denmark, LY-293111 de Lilly, ONO-4057 de Ono, TMK-688 Terumo, BI-RM-270 de Boehringer Ingelheim, LY 213024 de Lilly, LY 264086 de Lilly, LY 292728 de Lilly, ONO LB457 de Ono, 105696 de Pfizer, PF 10042 de Perdue Frederick, RP 66153 Rhone-Poulenc Rorer, SB-201146 SmithKline Beecham, SB-201993 SmithKline Beecham, SB-209247 SmithKline Beecham, SC-53228 de Searle, SM 15178 de Sumitamo, WAY 121006 de American Home Products, Bay-o-8276 de Bayer, CI-987 Warner-Lambert, CI-987BPC-
35 15LY 223982 de Warner-Lambert, LY 233569 de Lilly, LY-255283 de Lilly, MNX-160 de MacroNex, MK-591 Merck and Co., MK-886 Merck and Co., ONO-LB-448 de Ono, PL-5901 de Purdue Frederick, RG14893 de Rhone-Poulenc Rorer, RP 66364 Rhone-Poulenc Rorer, RP 69698 Rhone-Poulenc Rorer, S-2474 de Shionogi, SC-41930 de Searle, SC-50505 de Searle, SC-51146 de Searle, SC-52798 de Searle, SK&F-104493 de SmithKline Beecham, SR-2566 de Leo Denmark, T-757 de Tanabe y TEI-1338 de Teijin.

40 Otras cargas útiles farmacológicas útiles incluyen compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), Leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs) y Gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina,
50 trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo,
55 clomafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente calicheamicina gammall y calicheamicina omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato;
60 una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicina), morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, parfelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C,
65 ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, marfomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como

metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, thiamnirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; antipararrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxana; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (exento de Cremophor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel técnicamente diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Otras cargas útiles incluyen: (i) agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (los SERM, forma siglada de selective estrogen receptor modulator), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de la proteína quinasa; (v) inhibidores de la lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; un inhibidor de la topoisomerasa 1, tal como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (x) sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Otros agentes antiangiogénicos incluyen los inhibidores de la MMP-2 (metaloproteínasa de matriz 2), los inhibidores de la MMP-9 (metaloproteínasa de matriz 9), los inhibidores de la COX-II (ciclooxigenasa II) y los inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de VEGF. Los ejemplos de tales inhibidores de metaloproteínas de matriz útiles que pueden usarse en combinación con los presentes compuestos/composiciones se describen en los documentos WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606.046, EP 931.788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, la patente de Estados Unidos n.º 5.863.949, la patente de Estados Unidos n.º 5.861.510 y el documento 780.386, todos los cuales se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. Los ejemplos de inhibidores de la tirosina quinasa inhibidora del receptor de VEGF incluyen 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 en el documento WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)-quinazolina (AZD2171; Ejemplo 240 en el documento WO 00/47212), vatalanib (PTK787; documento WO 98/35985) y SU11248 (sunitinib; documento WO 01/60814), y compuestos tales como los divulgados en las publicaciones PCT n.º WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354).

En determinadas realizaciones, la carga útil es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de carga útil o fragmento puede estar codificado por cualquiera de los genes de inmunoglobulina reconocidos por los expertos en la materia. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero sin limitación, los genes de las regiones constantes de κ , λ , α , γ (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), δ , ϵ y μ , así como los genes de las regiones variables de inmunoglobulinas. El término incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo reconocidos por los expertos en la materia, y variantes de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, a Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv monocatenario (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de las CDR, las regiones variables, las regiones marco conservadas, las regiones constantes y similares.

En determinadas realizaciones, la carga útil es uno o más polímeros solubles en agua. Pueden unirse a los polipéptidos de unión a antígeno de la presente invención una amplia diversidad de polímeros macromoleculares y

5 otras moléculas, para modular las propiedades biológicas del anticuerpo y/o proporcionar nuevas propiedades biológicas al anticuerpo. Estos polímeros macromoleculares pueden unirse al anticuerpo a través de un aminoácido codificado de forma natural, a través de un aminoácido no codificado de forma natural, o cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural, o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido no natural. El peso molecular del polímero puede encontrarse en un amplio intervalo, incluyendo, pero sin limitación, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, o más.

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

15 La proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a las moléculas de anticuerpo variará, al igual que sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima (en términos de eficacia de reacción en la que hay un exceso mínimo de proteína o polímero sin reaccionar) puede determinarse por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y por el número de grupos reactivos disponibles. Como se relaciona con el peso molecular, normalmente cuanto más alto es el peso molecular del polímero, menor es el número de moléculas de polímero que pueden unirse a la proteína. De forma similar, cuando se optimizan estos parámetros se debe tener en cuenta la ramificación del polímero. En general, cuanto mayor es el peso molecular (o cuantas más ramificaciones) mayor es la relación de polímero:proteína.

20 El polímero soluble en agua puede tener cualquier forma estructural incluyendo, pero sin limitación, lineal, bifurcado o ramificado. Normalmente, el polímero soluble en agua es un poli(alquilenglicol), tal como poli(etilenglicol) (PEG), pero también se pueden emplear otros polímeros solubles en agua. A modo de ejemplo, el PEG se usa para describir determinadas realizaciones de la presente invención.

25 El PEG es un polímero muy conocido, soluble en agua, que está disponible en el mercado o puede prepararse por polimerización de apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y se puede representar como unido al anticuerpo mediante la fórmula: $XO-(CH_2CH_2O)_{=n}-CH_2CH_2-Y$, donde n es 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo, pero sin limitación, un alquilo $1-4$.

30 En algunos casos, un PEG utilizado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH_3 ("metoxi PEG"). Como alternativa, el PEG puede terminar en un grupo reactivo, formando de este modo un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se usan comúnmente para hacerse reaccionar con los grupos funcionales que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero sin limitación, grupos maleimida, carbonatos activados (incluyendo, pero sin limitación, éster p-nitrofenilo), ésteres activados (incluyendo, pero sin limitación, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenil éster) y aldehídos), así como grupos funcionales que son inertes con respecto a los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos no codificado de forma natural (incluyendo, pero sin limitación, grupos azida, grupos alquino). Cabe destacar que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior mediante Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido de unión a antígeno a través de un aminoácido de origen natural o no codificado de forma natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace amida, carbamato o urea a un grupo amina (incluyendo, pero sin limitación, la amina épsilon de la lisina o el extremo N) del polipéptido. Como alternativa, Y puede ser un enlace maleimida a un grupo tiol (incluyendo, pero sin limitación, el grupo tiol de la cisteína). Como alternativa, Y puede ser un enlace a un resto habitualmente no accesible a través de los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un grupo azida en el PEG con un grupo alquino en el anticuerpo, para formar un producto de cicloadición [3+2] de Huisgen. Como alternativa, se puede hacer reaccionar un grupo alquino en el PEG con un grupo azida presente en un aminoácido no codificado de forma natural, para formar un producto similar. En algunas realizaciones, se puede hacer reaccionar un nucleófilo fuerte (incluyendo, pero sin limitación, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido no codificado de forma natural para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según sea aplicable, que en algunos casos puede reducirse adicionalmente mediante el tratamiento con un agente reductor apropiado. Como alternativa, el nucleófilo fuerte puede incorporarse en el anticuerpo a través de un aminoácido no codificado de forma natural y usarse para hacerse reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero soluble en agua.

35 Se puede usar cualquier masa molecular para un PEG, prácticamente como se desee, incluyendo, pero sin limitación, de aproximadamente 100 Daltons (Da) a 100.000 Da o más según se desee (incluyendo, pero sin limitación, en ocasiones, 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). También se pueden usar PEG de cadena ramificada, incluyendo, pero sin limitación, las moléculas de PEG con cada cadena teniendo un PM que varía de 1-100 kDa (incluyendo, pero sin limitación, 1-50 kDa o 5-20 kDa). Se describe una amplia gama de moléculas de PEG en, incluyendo, pero sin limitación, el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., el catálogo de Nektar Therapeutics.

60 En general, al menos un extremo de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido no

codificado de forma natural. Por ejemplo, pueden usarse derivados de PEG que portan fracciones de alquino y azida para la reacción con cadenas laterales de aminoácidos, para unir PEG a aminoácidos no codificados de forma natural como se describe en el presente documento. Si los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden una azida, entonces el PEG normalmente contendrá una fracción alquino para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato) que contenga un grupo fosfina para efectuar la formación del enlace amida. Como alternativa, si los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden una azida, entonces el PEG contendrá una fracción azida para efectuar la formación del producto de cicloadición [3+2] Huisgen. Si los aminoácidos no codificados de forma natural comprenden un grupo carbonilo, el PEG normalmente comprenderá un potente nucleófilo (incluyendo, pero sin limitación, una hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o funcionalidad de semicarbazida) para efectuar la formación de enlaces de hidrazona, oxima y semicarbazona correspondientes, respectivamente. En otras alternativas, se puede utilizar una inversión de la orientación de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, una fracción azida en el aminoácido no codificado de forma natural puede hacerse reaccionar con un derivado de PEG que contiene un alquino.

15 En algunas realizaciones, la variante de anticuerpo con un derivado de PEG contiene una funcionalidad química que es reactiva con la funcionalidad química presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural.

En determinadas realizaciones, la carga útil es un polímero que contiene azida o acetileno que comprende una estructura principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa. La estructura principal del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, debe entenderse que una amplia diversidad de polímeros solubles en agua que incluyen, pero sin limitación, poli(etilenglicol) y otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas tales moléculas. El término PEG incluye, pero sin limitación, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG de múltiples brazos, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, teniendo PEG o los polímeros relacionados uno o más grupos funcionales colgantes en la estructura principal del polímero), o PEG con enlaces biodegradables en él.

30 La estructura principal del polímero puede ser lineal o ramificada. Las estructuras principales del polímero se conocen generalmente en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene una fracción núcleo de rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de rama central. El PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tal como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de rama central también se puede deriva a partir de varios aminoácidos, tal como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como $R(-PEG-OH)_m$, en que R se deriva de una fracción núcleo, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y m representan el número de brazos. Las moléculas de PEG de múltiples brazos, tales como las descritas en las patentes de Estados Unidos N.º 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 2003/0143596; documento WO 96/21469; y el documento WO 93/21259, cada una de las cuales, también se puede usar como la estructura principal del polímero.

El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por $PEG(-YCHZ_2)_n$, donde Y es un grupo de unión y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

45 Otra forma ramificada, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, tales como carboxilo, a lo largo de la estructura principal de PEG en lugar de en el extremo de las cadenas de PEG.

Además de estas formas de PEG, el polímero también se puede preparar con enlaces débiles o degradables en la estructura principal. Por ejemplo, El PEG se puede preparar con enlaces éster, en la estructura principal del polímero, que están sujetos a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular: $-PEG-CO_2-PEG-H_2O \rightarrow PEG-CO_2H + HO-PEG-$ Los expertos en la materia entienden que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los divulgados en el presente documento.

55 Además son adecuados para su uso en la presente invención muchos otros polímeros. En algunas realizaciones, las estructuras principales del polímero que son solubles en agua, con de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilenglicoles), tal como poli(propilenglicol) ("PEG"), copolímeros de los mismos (incluyendo, pero sin limitación, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura principal del polímero puede variar, normalmente está en el intervalo de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

65 Los expertos en la materia reconocerán que el listado anterior sustancialmente para estructuras principales solubles en agua no es de ningún modo exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso en la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención, los derivados de polímero son "multifuncionales", lo que significa que el esqueleto principal del polímero tiene al menos dos extremos, y posiblemente tantos como aproximadamente 300 extremos, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados de polímero multifuncionales incluyen, pero sin limitación, polímeros lineales que tienen dos extremos, estando enlazado cada extremo a un grupo funcional que puede ser igual o distinto.

En una realización, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-POLY-B - N=N=N en donde: N=N=N es una fracción azida; B es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente; POLY es un polímero soluble en agua no antigénico; A es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual a B o distinto; y X es un segundo grupo funcional. Los ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo funcionalizado de forma múltiple que contiene hasta 18 y más preferentemente entre 1-10 átomos de carbono. Se puede incluir en la cadena de alquilo un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y más preferentemente de 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido por uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o átomos de azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen los grupos de enlace descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que el listado anterior de fracciones de unión no es de ninguna manera exhaustivo y es meramente ilustrativo, y que todas las fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuadas para su uso en la presente invención.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alqueno, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, grupos amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y azida. Como entienden los expertos en la materia, la fracción X seleccionada debe ser compatible con el grupo azida de forma que no se produzca reacción con el grupo azida. Los derivados de polímero que contienen azida pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción de azida o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional distinto.

El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo o fracción protectora que impide la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar del grupo de *tert*-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como el ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo, *tert*-butilo. También se pueden usar en la presente invención otros grupos protectores conocidos en la técnica.

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

En determinadas realizaciones de la presente invención, los derivados de polímero de la invención comprenden una estructura principal del polímero que tiene la estructura: X-CH₂CH₂O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-N=N=N en donde: X es un grupo funcional como se describe anteriormente; y n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000. En

otra realización, los derivados de polímero de la invención comprenden una estructura principal del polímero que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-N=N=N$ en donde: W es una fracción de enlazador alifático o aromático que comprende entre 1-10 átomos de carbono; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; X es un grupo funcional como se describe anteriormente; y m está entre 1 y 10.

5 Los derivados de PEG que contienen azida de la invención se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la técnica y/o divulgados en el presente documento. En un método, mostrado a continuación, una estructura principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa, teniendo la estructura principal del polímero un primer extremo enlazado a un primer grupo funcional y un segundo extremo enlazado a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con un anión de azida (que puede emparejarse con cualquiera de una serie de contraiones adecuados, incluyendo sodio, potasio, *terc*-butilamonio, etc.). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción de azida, lo que proporciona el polímero de PEG que contiene azida deseado como se muestra a continuación: $X-PEG-L+N_3^- \rightarrow X-PEG-N_3$.

15 Como se muestra, una estructura principal del polímero adecuada para su uso en la presente invención tiene la fórmula X-PEG-L, en donde PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo funcional que no reacciona con los grupos azida y L es un grupo saliente adecuado. Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alqueno, grupos amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina, y vinilpiridina, y cetona. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato.

25 En otro método para la preparación de derivados de polímero que contienen azida de la presente invención, un agente de unión que porta una funcionalidad azida se pone en contacto con una estructura principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa, en donde el agente de unión porta una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero de PEG, para formar un producto derivado de polímero que contiene azida, en donde la azida se separa de la estructura principal del polímero por un grupo de unión.

30 A continuación se representa un esquema de reacción a modo de ejemplo: $X-PEG-M+N$ -enlazador- $N=N=N \rightarrow PG-X-PEG$ -enlazador- $N=N=N$ en donde: PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo terminación tal como alcoxi o un grupo funcional como se describe anteriormente; y M es un grupo funcional que no es reactivo con la funcionalidad azida pero que reaccionará de forma eficaz y selectiva con el grupo funcional N.

35 Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, siendo M un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; siendo M una cetona si N es una hidrazida o una fracción aminooxi; siendo M un grupo saliente si N es un nucleófilo.

40 La purificación del producto crudo se puede lograr por métodos conocidos que incluyen, pero sin limitación, la precipitación del producto seguida de cromatografía, si es necesario.

45 A continuación se muestra un ejemplo más específico en el caso de PEG diamina, en que una de las aminas está protegida por una fracción de grupo protector tal como *terc*-butil-Boc, y el PEG diamina mono protegido resultante se hace reaccionar con una fracción de enlace que porta la funcionalidad azida: $BocHN-PEG-NH_2+HO_2C-(CH_2)_3-N=N=N$.

50 En este caso, el grupo amina se puede acoplar al grupo de ácido carboxílico utilizando diversos agentes activadores tal como el cloruro de tionilo o los reactivos de carbodiimida, y la N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace amida entre el derivado de PEG monoamina y la fracción de enlazador que porta azida. Después de la formación satisfactoria del enlace amida, el derivado resultante que contiene azida protegido con N-*terc*-butil-Boc se puede usar directamente para modificar moléculas bioactivas o se puede elaborar adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo N-t-Boc puede hidrolizarse por tratamiento con un ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante se puede usar como un asa sintética para instalar otra funcionalidad útil, tal como los grupos de maleimida, disulfuros activados, ésteres activados, etc., para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

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

65 En otra realización de la invención, el derivado de polímero tiene la estructura: $X-A-POLY-B-C=C-R$ en donde: R puede ser H o un alquilo, alqueno, alquioxo, o un grupo arilo o arilo sustituido; B es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente; POLY es un polímero soluble en agua no antigénico; A es una fracción de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual a B o distinto; y X es un segundo grupo funcional.

Los ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo funcionalizado de forma múltiple que contiene hasta 18 y más preferentemente entre 1-10 átomos de carbono. Se puede incluir en la cadena de alquilo un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y más preferentemente de 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido por uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o átomos de azufre. Otros ejemplos de grupos de enlace adecuados incluyen los grupos de unión descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.932.462 y 5.643.575, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos WO 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que el listado anterior de fracciones de unión no es de ninguna manera exhaustivo y pretende ser meramente ilustrativo, y que una amplia diversidad de fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contempla como útiles en la presente invención.

Los ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tal como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, hidratos de aldehído, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, grupos amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos y tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Como se entenderá, la fracción X seleccionada debe ser compatible con el grupo acetileno de forma que no se produzca reacción con el grupo acetileno. Los derivados de polímero que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción acetileno o heterobifuncional, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional distinto.

En otra realización de la presente invención, los derivados de polímero comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura: $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C=CH$ en donde: X es un grupo funcional como se describe anteriormente; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y m está entre 1 y 10. A continuación se muestran ejemplos específicos de cada uno de los polímeros heterobifuncionales de PEG.

Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención se pueden preparar usando métodos conocidos por los expertos en la materia y/o divulgados en el presente documento. En un método, una estructura principal del polímero soluble en agua que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa, teniendo la estructura principal del polímero un primer extremo enlazado a un primer grupo funcional y un segundo extremo enlazado a un grupo nucleófilo adecuado, se hace reaccionar con un compuesto que porta una funcionalidad de acetileno y un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando se combinan el polímero de PEG que porta la fracción nucleófila y la molécula que porta el grupo saliente, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción nucleófila, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado: $X-PEG-Nu+L-A-C \rightarrow X-PEG-Nu-A-C=CR'$.

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

Los ejemplos de Nu incluyen, pero sin limitación, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxi que reaccionarían principalmente a través de un mecanismo de tipo SN2. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen los grupos funcionales que reaccionarían principalmente a través de una reacción de adición nucleófila. Los ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato, y otros grupos que se espera que experimenten desplazamiento nucleófilo, así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

En otra realización de la presente invención, A es un enlazador alifático de entre 1-10 átomos de carbono o un anillo de arilo sustituido de entre 6-14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con los grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

En otro método para la preparación de derivados de polímero que contienen acetileno de la invención, un polímero de PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa, que porta un grupo funcional protegido o un agente de terminación en un extremo y un grupo saliente adecuado en el otro extremo, se pone en contacto con un anión acetileno.

Los polímeros solubles en agua pueden estar unidos a los anticuerpos de la invención. Los polímeros solubles en agua pueden unirse a través de un aminoácido no codificado de forma natural incorporado en los anticuerpos, o de cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido no codificado de forma natural o codificado de forma natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido no codificado de forma natural o codificado de forma natural. Como alternativa, los polímeros solubles en agua están unidos a un polipéptido de unión a antígeno que incorpora un aminoácido no codificado de forma natural a través de un aminoácido de origen natural

(incluyendo, pero sin limitación, cisteína, lisina o el grupo amina del resto N-terminal). En algunos casos, los anticuerpos de la invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos no naturales, en donde uno o más aminoácidos no codificados de forma natural están unidos a un polímero (o polímeros) soluble en agua (incluyendo, pero sin limitación, PEG y/u oligosacáridos). En algunos casos, los anticuerpos de la invención comprenden

5 adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no codificados de forma natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunos ejemplos, el anticuerpo descrito en el presente documento comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural unidos a polímeros solubles en agua y uno o más aminoácidos de origen natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua en la presente divulgación potencian la semivida en suero de los anticuerpos con respecto a la forma no conjugada.

10 Se puede ajustar el número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido de unión a antígeno (es decir, el grado de PEGilación o glucosilación) de la presente invención para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica modificada (incluyendo, pero sin limitación, aumentada o disminuida, tal como la semivida *in vivo*). En algunas realizaciones, se aumenta la semivida del anticuerpo en al menos aproximadamente el

15 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces con respecto a un polipéptido no modificado.

20 En una realización de la presente invención, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción de hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal que está unida directamente a la estructura principal del PEG.

25 En algunas realizaciones, el derivado de PEG con hidroxilamina terminal tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

30 En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

35 En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene semicarbazida tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

40 En otra realización de la invención, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción de hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal que está unida a la estructura principal del PEG mediante un enlace amida.

45 En algunas realizaciones, los derivados de PEG con hidroxilamina terminal tendrán la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

50 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrán la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

55 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contiene semicarbazida tendrán la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

60 En otra realización de la invención, un anticuerpo que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción de hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10-40 kDa y, más preferentemente, de 5-20 kDa.

65 En otra realización de la invención, un anticuerpo que comprende un aminoácido no codificado de forma natural se modifica con un derivado de PEG que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con hidrazina o hidrazida terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo semicarbazida tendrán la estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100-1.000.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo hidroxilamina tendrán la estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo,

etc.), X es opcionalmente NH, O, S, C(O) o no está presente, m es 2-10 y n es 100 -1.000.

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

5 Los métodos y la química para la activación de polímeros, así como para la conjugación de péptidos, se describen en la bibliografía y se conocen en la técnica. Los métodos comúnmente utilizados para la activación de polímeros incluyen, pero sin limitación, activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epíclorhidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (véase, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L., *et al.*, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

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

20 Los métodos para la activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la patente de Estados Unidos n.º 5.324.844, WO 94/18247, WO 94/04193, la patente de Estados Unidos n.º 5.219.564, la patente de Estados Unidos n.º 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de Estados Unidos n.º 5.281.698, y el documento WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo, entre otros, el factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), una molécula que transporta oxígeno (patente de Estados Unidos n.º 4.412.989), ribonucleasa o superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985)).

30 La PEGilación (es decir, la adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos de unión a antígeno que contienen un aminoácido no codificado de forma natural, tal como una p-azido-L-fenilalanina, se lleva a cabo mediante cualquier método conveniente. Por ejemplo, el anticuerpo se PEGila con un derivado de mPEG terminado en alquino. Brevemente, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH₂-C=CH sólido, con agitación, a una solución acuosa de anticuerpo que contiene p-azido-L-Phe a temperatura ambiente. Normalmente, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene un pK_a cerca del pH al cual se va a llevar a cabo la reacción (generalmente, aproximadamente pH 4-10). Los ejemplos de tampones adecuados para la PEGilación a pH 7,5, por ejemplo, incluyen, pero sin limitación, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS y TES. El pH se controla y ajusta continuamente si es necesario. La reacción normalmente se deja continuar durante aproximadamente 1-48 horas.

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

50 Si es necesario, los anticuerpos PEGilados obtenidos de la cromatografía hidrófoba pueden purificarse adicionalmente mediante uno o más procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (que utiliza, incluyendo, pero sin limitación, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice; HPLC en fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo, pero sin limitación, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por quelato de metales; ultrafiltración/diafiltración; precipitación con etanol; precipitación en sulfato de amonio; cromatografía de amonio; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluyendo, pero sin limitación, isoelectrofoque preparativo), solubilidad diferencial (incluyendo, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar por CPG por comparación con patrones de proteínas globulares (PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris y Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado de anticuerpo-PEG se puede evaluar mediante degradación proteolítica (incluyendo, pero sin limitación, escisión con tripsina) seguido de un análisis por espectrometría de masas. Pepinsky B., *et al.*, *J. Pharmcol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66 (2001).

65 Un polímero soluble en agua unido a un aminoácido de un anticuerpo de la invención se puede derivatizar o sustituir adicionalmente sin limitación.

En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción de azida que reaccionará con una fracción de alquino presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

5 En algunas realizaciones, el derivado de PEG con azida terminal tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

10 En otra realización, el derivado de PEG con azida terminal tendrá la estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$, donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

15 En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción de azida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10-40 kDa y, más preferentemente, de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con azida terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-N_3$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o un grupo carbonilo (C=O), en cada caso que puede estar presente o ausente.

20 En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción de alquino que reaccionará con una fracción de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural.

25 En algunas realizaciones, el derivado de PEG con alquino terminal tendrá la siguiente estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio es de entre 5-40 kDa).

30 En otro ejemplo, un anticuerpo que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene un alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene una azida terminal o fracción de alquino terminal que está unido a la estructura principal de PEG por medio de un enlace amida.

35 En algunas realizaciones, el derivado de PEG con alquino terminal tendrá la siguiente estructura: $RO-(CH_2CH_2O)_m-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000.

40 En otro ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno que comprende un aminoácido que contiene azida se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción de alquino terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un PM que varía de 10-40 kDa y, más preferentemente, de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG con alquino terminal tendrá la siguiente estructura: $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p-C=CH$ donde R es un alquilo simple (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o un grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

45 En otro ejemplo, se modifica un anticuerpo con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (incluyendo, pero sin limitación, éster, carbonato) que comprende adicionalmente un grupo aril fosfina que reaccionará con una fracción de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular promedio de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

50 Otras moléculas de PEG a modo de ejemplo que pueden estar unidas a anticuerpos, así como los métodos de PEGilación, incluyen los descritos en, por ejemplo, publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0027217; 2001/0021763; patentes de Estados Unidos N.º 6.646.110; 5.824.778; 5.476.653; 5.219.564; 5.629.384; 5.736.625; 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.473.034; 5.516.673; 5.382.657; 6.552.167; 6.610.281; 6.515.100; 6.461.603; 6.436.386; 6.214.966; 5.990.237; 5.900.461; 5.739.208; 5.672.662; 5.446.090; 5.808.096; 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339; 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 5.559.213; 5.612.460; 5.747.646; 5.834.594; 5.849.860; 5.980.948; 6.004.573; 6.129.912; WO 97/32607, EP 229.108, EP 402.378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en el presente documento puede usarse en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, monocatenarias, de cadena ramificada, de cadena de múltiples brazos, funcional individual, bifuncional, multifuncional o cualquier combinación de las mismas.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden unirse a las cargas útiles con uno o más enlazadores que tengan la capacidad de reaccionar con el aminoácido no natural. El uno o más enlazadores puede ser cualquiera de los enlazadores evidentes para los expertos en la materia. El término "enlazador" se usa en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y normalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles, incluyendo, pero sin limitación, en condiciones fisiológicas durante un período prolongado de tiempo, tal vez incluso de forma indefinida. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace puede degradarse mediante una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, El PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura principal del polímero o en el grupo enlazador entre la estructura principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de los ácidos carboxílicos del PEG o los ácidos carboxílicos del PEG activados con grupos alcohólicos en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero sin limitación, enlaces carbonato; enlaces imina que son el resultado de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de la reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ostoéster que son el producto de la reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluyendo, pero sin limitación, en un extremo de un polímero tal como PEG y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamídita, incluyendo, pero sin limitación, en el extremo de un polímero y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido. En los anticuerpos de la invención pueden usarse enlazadores ramificados. Los expertos en la materia conocen varios enlazadores escindibles distintos. Véanse las patentes de Estados Unidos N.º 4.618.492; 4.542.225 y 4.625.014. Los mecanismos para la liberación de un agente de estos grupos de enlazadores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis catalizada por ácido. La patente de Estados Unidos n.º 4.671.958, por ejemplo, incluye una descripción de inmunocombinados que comprenden enlazadores que se escinden en el sitio diana *in vivo* mediante enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. La longitud del enlazador se puede predeterminar o seleccionar dependiendo de una relación espacial deseada entre el anticuerpo y la molécula unida a él. En vista del gran número de métodos que se han informado para acoplar diversos compuestos para radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a los anticuerpos, un experto en la materia podrá determinar un método adecuado para acoplar un agente dado a un anticuerpo.

Para unir los conjugados se puede usar cualquier enlazador hetero u homobifuncional. El enlazador puede tener un amplio intervalo de pesos moleculares o de longitudes moleculares. Se pueden usar enlazadores de peso molecular más grande o más pequeño para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre el anticuerpo y la entidad enlazada. Los enlazadores que tienen una longitud molecular más larga o más corta también se pueden usar para proporcionar un espacio o flexibilidad deseados entre el anticuerpo y la entidad enlazada. De forma similar, puede utilizarse un enlazador que tenga una forma o conformación particular para impartir una forma o conformación particular al anticuerpo o la entidad enlazada, ya sea antes o después de que el anticuerpo alcance su diana. Para modular la liberación de un anticuerpo o una carga útil en las condiciones deseadas pueden seleccionarse los grupos funcionales presentes en cada extremo del enlazador. Esta optimización de la relación espacial entre el anticuerpo y la entidad enlazada puede proporcionar propiedades nuevas, moduladas o deseadas a la molécula.

En algunas realizaciones, la presente divulgación describe enlazadores bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura de "mancuerna" que incluye: a) una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, una hidroxilamina o una fracción que contiene carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura principal del polímero; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la estructura principal del polímero. El segundo grupo funcional puede ser igual o distinto al primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional. La divulgación proporciona, en algunas realizaciones, compuestos solubles en agua que comprenden al menos un brazo de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

55 *Anticuerpos parentales*

El anticuerpo parental puede ser cualquier anticuerpo IgG conocido por los expertos en la materia, o descubierto más tarde, sin limitación. El anticuerpo parental puede estar sustancialmente codificado por un gen de anticuerpo o genes de anticuerpo de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación, de seres humanos, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas, dromedarios, monos, en particular de mamíferos y en particular de ser humano, y en particular de ratones y ratas. En una realización, el anticuerpo parental puede ser completamente humano, obtenido, por ejemplo, de un paciente o sujeto, utilizando ratones transgénicos u otros animales (Bruggemann y Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección (Griffiths y Duncan, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:102-108). El anticuerpo parental puede ser de cualquier fuente, incluyendo artificiales o de origen natural. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo técnicamente modificado, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (Clark, 2000,

Immunol. Today 21:397-402) u obtenidos de una biblioteca combinatoria. Además, el anticuerpo parental puede ser una variante técnicamente modificada de un anticuerpo que está sustancialmente codificado por uno o más genes de anticuerpos naturales. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo parental es un anticuerpo que se ha identificado por maduración de afinidad.

5 El anticuerpo parental puede tener afinidad por cualquier antígeno conocido por los expertos en la materia, o descubierto más tarde. Prácticamente cualquier sustancia puede ser un antígeno para un anticuerpo parental o para un anticuerpo de la presente descripción. Los ejemplos de antígenos útiles incluyen, pero sin limitación, Antitripsina alfa-1, Angiostatina, Factor antihemolítico, anticuerpos, Apolipoproteína, Apoproteína, Factor natriurético auricular, Polipéptido natriurético auricular, Péptidos auriculares, quimiocinas C-X-C (por ejemplo, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), calcitonina, quimiocinas CC (por ejemplo, proteína quimioatrayente de monocitos 1, proteína quimioatrayente de monocitos 2, proteína quimioatrayente de monocitos 3, proteína inflamatoria de monocitos 1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos 1 beta, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), ligando CD40, ligando C-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor del complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citocinas, (por ejemplo, péptido activador de neutrófilos epiteliales 78, GRO/MGSA, GRO, GRO, MIP-1, MIP-1, MCP-1), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina ("EPO"), toxinas exfoliativas A y B, factor IX, factor VII, factor VIII, factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, G-CSF, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factores de crecimiento, proteínas hedgehog (por ejemplo, Sonic, Indian, Desert), hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hirudina, seroalbúmina humana, insulina, factor de crecimiento insulínico (IGF), interferones (por ejemplo, IFN- α , IFN-, IFN- γ), interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, etc.), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de la leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (FIN), oncostatina M, proteína osteogénica, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormonas peptídicas (por ejemplo, hormona del crecimiento humano), pleiotropina, proteína A, proteína G, exotoxinas pirogénicas A, B y C, relaxina, renina, SCF, receptores del complemento soluble I, I-CAM 1 soluble, receptores de interleucinas solubles (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptocinas, superantígenos, es decir, enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), superóxido dismutasa, toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1), timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de necrosis tumoral (TNF beta), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa y otros. Estos antígenos pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, de fuentes comerciales o de secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas publicadas (por ejemplo, Genbank).

35 Los antígenos adicionales incluyen, pero sin limitación, activadores de la transcripción y de la expresión. Los activadores de la transcripción y de la expresión a modo de ejemplo incluyen genes y proteínas que modulan el crecimiento celular, la diferenciación, la regulación, o similares. Los activadores de la expresión y de la transcripción se encuentran en los procariontes, los virus y los eucariotes, incluyendo hongos, plantas y animales, incluyendo mamíferos, lo que proporciona una amplia gama de dianas terapéuticas. Se apreciará que los activadores de la expresión y de la transcripción regulan la transcripción mediante muchos mecanismos, por ejemplo, al unirse a receptores, estimulando una cascada de transducción de señales, regulando la expresión de factores de transcripción, uniéndose a promotores y potenciadores, uniéndose a proteínas que se unen a promotores y potenciadores, desenrollando el ADN, cortando y empalmado pre-ARN, poliadenilando ARN y degradando ARN. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, activadores de la expresión tales como citocinas, moléculas inflamatorias, factores de crecimiento, sus receptores y producto de oncogenes, por ejemplo, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-8, etc.), interferones, FGF, IGF-I, IGF-II, FGF, PDGF, TNF, TGF- α , TGF- β , EGF, KGF, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4VCAM-1, ICAM-I/IFA-1 y hialurina/CD44; moléculas de transducción de señales y los correspondientes productos oncogénicos, por ejemplo, Mos, Ras, Raf y Met; y activadores y supresores de la transcripción, por ejemplo, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, y receptores de hormonas esteroideas tales como los de estrógeno, progesterona, testosterona, aldosterona, el ligando del receptor de LDL y corticosterona.

Las proteínas vacunales pueden ser antígenos, incluyendo, pero sin limitación, proteínas de hongos infecciosos, por ejemplo, *Aspergillus*, especies de *Candida*; bacterias, en particular *E. coli*, que sirve un modelo para bacterias patógenas, así como bacterias médicamente importantes tales como estafilococos (por ejemplo, *aureus*) o estreptococos (por ejemplo, *pneumoniae*); protozoos tales como esporozoos (por ejemplo, *Plasmodia*), rizópodos (por ejemplo, *Entamoeba*) y flagelados (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Giardia*, etc.); virus tales con virus de ARN (+) (los ejemplos incluyen poxvirus, por ejemplo, virus de la variolovacuna; picornavirus, por ejemplo, de la polio; togavirus, por ejemplo, de la rubeola; flavivirus, por ejemplo, el VHC; y coronavirus), virus de ARN (-) (por ejemplo, rhabdovirus, por ejemplo, VSV; paramixovirus, por ejemplo, VRS; ortomixovirus, por ejemplo, de la gripe; bunyavirus; y arenavirus), virus de ADNbc (por ejemplo, reovirus), virus de ARN a ADN, es decir, retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV, y determinados virus de ADN a ARN tal como de la hepatitis B.

Los antígenos pueden ser enzimas, incluyendo, pero sin limitación, amidasas, racemasas de aminoácidos, acilasas, deshalogenasas, dioxigenasas, diarilpropano peroxidadas, epimerasas, epóxido hidrolasas, estereras, isomereras, quinasas, glucosa isomereras, glucosidasas, glucosil transferasas, haloperoxidasas, monooxigenasas (por ejemplo, p450s), lipasas, lignina peroxidadas, nitrilo hidratadas, nitrilasas, proteasas, fosfatasas, subtilisinas, transaminasa y

nucleasas.

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

Por ejemplo, el antígeno puede ser una molécula asociada a la enfermedad, tal como un antígeno de superficie tumoral, tal como los idiotipos de linfocitos B, CD20 en linfocitos B malignos, CD33 en blastos leucémicos y HER2/neu en cáncer de mama. Como alternativa, el antígeno puede ser un receptor de factor de crecimiento. Los factores de crecimiento incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento epidérmico (los EGF), transferrina, factor insulínico de crecimiento, factores de crecimiento transformantes (los TGF), interleucina 1 e interleucina 2. Por ejemplo, se ha encontrado una alta expresión de receptores de EGF en una amplia diversidad de tumores primarios epiteliales humanos. Se ha encontrado que el TGF- α media en una ruta de estimulación autocrina en células cancerosas. Se ha demostrado que varios anticuerpos monoclonales murinos tienen la capacidad de unirse a los receptores de EGF, bloquear la unión del ligando a los receptores de EGF e inhibir la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer humano en cultivo y en modelos de xenoinjerto. Mendelsohn y Baselga (1995) *Antibodies to growth factors and receptors*, en *Biologic Therapy of Cancer*, 2ª Ed., J B Lippincott, Filadelfia, págs. 607-623. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar diversos cánceres.

El antígeno también puede ser una proteína de superficie celular o un receptor asociado a arteriopatía coronaria, tal como el receptor de la glucoproteína IIb/IIIa plaquetaria, enfermedades autoinmunitarias tales como CD4, CAMPATH-1 y la región de lípido A del lipopolisacárido bacteriano gramnegativo. Los anticuerpos humanizados contra CD4 se han analizado en ensayos clínicos en el tratamiento de pacientes con micosis fungoide, psoriasis pustular generalizada, psoriasis grave y artritis reumatoide. Los anticuerpos contra la región de lípido A del lipopolisacárido bacteriano gramnegativo se han analizado clínicamente en el tratamiento del choque séptico. Los anticuerpos contra CAMPATH-1 también se han analizado clínicamente en el tratamiento de la artritis reumatoide refractaria. Por lo tanto, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden usar para tratar diversas enfermedades autoinmunitarias.

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

El antígeno también puede ser una superficie vírica o una proteína central que puede servir como un antígeno para desencadenar la respuesta inmunitaria del hospedador. Los ejemplos de estas proteínas víricas incluyen, pero sin limitación, glucoproteínas (o antígenos de superficie, por ejemplo, GP120 y GP41) y proteínas de la cápside (o proteínas estructurales, por ejemplo, la proteína P24); antígenos de superficie o proteínas centrales del virus de la hepatitis A, B, C, D o E (por ejemplo, antígeno pequeño de superficie del virus de la hepatitis B (SHBsAg) del virus de la hepatitis B y las proteínas centrales del virus de la hepatitis C, antígenos NS3, NS4 y NS5); glucoproteína (proteína G) o la proteína de fusión (proteína F) del virus respiratorio sincicial (VRS); proteínas de la superficie y centrales del virus del herpes simple VHS-1 y VHS-2 (por ejemplo, glucoproteína D de VHS-2).

El antígeno también puede ser un producto de un gen supresor tumoral mutado que ha perdido su función supresora de tumores y puede hacer a las células más susceptibles al cáncer. Los genes supresores tumorales son genes que funcionan para inhibir el crecimiento celular y los ciclos de división, previniendo así el desarrollo de neoplasia. Las mutaciones en los genes supresores tumorales provocan que la célula ignore uno o más de los componentes de la red de señales inhibitorias, superando los puntos de control del ciclo celular y dando como resultado una mayor tasa de crecimiento celular del cáncer controlado. Los ejemplos de genes supresores tumorales incluyen, pero sin limitación, DPC-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 y BRCA2. DPC-4 está implicado en el cáncer de páncreas y participa en una ruta citoplásmica que inhibe la división celular. NF-1 codifica una proteína que inhibe a Ras, una proteína inhibidora citoplasmática. NF-1 está implicado en el neurofibroma y feocromocitomas del sistema nervioso y la leucemia mieloide. NF-2 codifica una proteína nuclear que está implicada en el meningioma, el schwannoma y el ependimoma del sistema nervioso. RB codifica la proteína pRB, una proteína nuclear que es un inhibidor importante del ciclo celular. RB está implicado en el retinoblastoma así como también cáncer de hueso, vejiga, cáncer de pulmón microcítico y de mama. p53 codifica la proteína p53, que regula la división celular y puede inducir apoptosis. La mutación y/o inactivación de p53 se encuentra en una amplia diversidad de cánceres. WT1 está implicado en el tumor de Wilms de los riñones. BRCA1 está implicado en el cáncer de mama y de ovario, y BRCA2 está implicado

en el cáncer de mama. Por lo tanto, los anticuerpos se pueden usar para bloquear las interacciones del producto génico con otras proteínas o productos bioquímicos en las rutas de inicio y desarrollo del tumor.

5 El antígeno puede ser una molécula CD, incluyendo, pero sin limitación, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 α , CD8 β , CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, 10 CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw18, CDw109, CD110-113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, 15 CD129, CDw130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 y TCR ζ . El antígeno puede ser el VEGF, el receptor del VEGF, EGFR, Her2, TNF α , el receptor de TNFR1, GPIIb/IIIa, cadena alfa de IL-2R, cadena beta de IL-2R, proteína F del VRS, integrina alfa 4, IgE, receptor de IgE, digoxina, veneno de la víbora alfombra, complemento C5, OPGL, antígeno tumoral CA-125, proteínas de estafilococos, proteínas de *Staphylococcus epidermidis*, proteínas de *Staphylococcus aureus*, proteínas implicadas en la infección estafilocócica (incluyendo, pero sin limitación, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), receptor de IL-6, CTLA-4, VRS, subunidad Tac del receptor de IL-2, IL-5 y EpCam. En determinadas realizaciones, el antígeno es CD74. El antígeno puede ser un fragmento de una molécula.

25 Los anticuerpos parentales pueden ser cualquier anticuerpo IgG conocido en la técnica o cualquier anticuerpo desarrollado por los expertos en la materia, sin limitación. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, anticuerpo anti-TNF (patente de Estados Unidos n.º 6.258.562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (patente de Estados Unidos n.º 6.914.128); anticuerpo anti-IL-18 (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2005/0147610), anti-05, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti CD-40 (por ejemplo, véase la publicación PCT n.º WO 2007/124299), anti-Id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-beta 2, anti-HGF, anti-cMet, anti DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Fact VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-RON, anti-SOST, anti CD-19, anti CD80 (por ejemplo, véase la publicación PCT n.º WO 2003/039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alpha4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti CD22 (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.789.554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR alfa beta, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gpIIbIIIa, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti IGFR, anti-VNRIintegrina, anti-IL-1 alfa, anti-IL-1beta, anti-receptor de IL-1, anti-receptor de IL-2, anti-IL-4, anti-receptor de IL-4, anti-IL5, anti-receptor de IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor de IL-13, anti-IL-17, anti-IL-6R, anti-RANKL, 40 anti-NGF, anti-DKK, anti-alfaVbeta3, anti-IL-17A, anti-IL23p19 y anti-IL-23 (véase Presta, L. G. (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731-.

45 Los anticuerpos parentales también pueden seleccionarse de diversos anticuerpos terapéuticos aprobados para su uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo para uso clínico. Dichos anticuerpos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.736.137), un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para tratar el linfoma no Hodgkin; HuMax-CD20, un anticuerpo anti-CD20 actualmente en desarrollo por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (N.º de publicación PCT PCT/US2003/040426), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) 50 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.677.171), un anticuerpo humanizado anti-Her2/neu aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente en desarrollo por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 (patente de Estados Unidos n.º 4.753.894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (patente de Estados Unidos N.º 4.943.533; publicación PCT n.º WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para diversos cánceres; ABX-EGF (patente de Estados Unidos N.º 6.235.883), actualmente en desarrollo por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (patente de Estados Unidos N.º 7.247.301), actualmente en desarrollo por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (patente de Estados Unidos n.º 5.558.864; Murthy, *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck, *et al.* (1987) J. Cell. Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough, *et al.* (1991) Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (publicación PCT n.º WO 95/20045; Modjtahedi, *et al.* (1993) J. Cell. Biophys. 22(1-3): 129-46; Modjtahedi, *et al.* (1993) Br. J. Cancer 67(2): 247-53; Modjtahedi, *et al.* (1996) Br. J. Cancer 73(2): 228-35; Modjtahedi, *et al.* (2003) Int. J. Cancer 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Inmunología Molecular, Cuba) (patente de Estados Unidos N.º 5.891.996; patente de Estados Unidos n.º 6.506.883; Mateo, *et al.* (1997) Immunotechnol. 3(1): 71-81); AcM-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (publicación PCT n.º WO 01/62931A2); y SC100 (Scancell) (publicación PCT n.º WO 01/88138); 65 alemtuzumab (Campath®, Millenium), un AcM humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia

linfocítica crónica de linfocitos B; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), un anticuerpo anti-fusión LFA-3 Fc desarrollado por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por Medimmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade® (AS 1407), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo para TNF completamente humana desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel®), una fusión de Fc y del receptor de TNF p75 desarrollado por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de Fc y del receptor de TNF p55 desarrollada previamente por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 en desarrollo por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 en desarrollo por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 en desarrollo por Abgenix, Pentumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, AngioMab (AS 1405), en desarrollo por Antisoma, HuBC-1, en desarrollo por Antisoma, Thioplatin (AS 1407), en desarrollo por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 en desarrollo por Biogen, Acm para VLA-1, un anticuerpo anti-integrina VLA-1 en desarrollo por Biogen, un Acm para LTBR, un anticuerpo anti-receptor de linfotóxina beta (LTBR) en desarrollo por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 en desarrollo por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGF-β1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina 1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., Acm para TRAIL-R1, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin® bevacizumab, rhuMab-VEGF, un anticuerpo anti-VEGF en desarrollo por Genentech, un anticuerpo anti-familia del receptor de HER en desarrollo por Genentech, Anti-Tissue Factor (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular en desarrollo por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE en desarrollo por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a en desarrollo por Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (anteriormente LDP-02), en desarrollo por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, en desarrollo por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I en desarrollo por Genmab y Medarex, HuMax-Lymphoma, en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, en desarrollo por Genmab, IDEC-131 y un anticuerpo anti-CD40L en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD 23 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) que está desarrollando IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo antidiotipo en desarrollo por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR en desarrollo por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 en desarrollo por Imclone, un anticuerpo anti-cadherina VE en desarrollo por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (ACE) en desarrollo por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 en desarrollo por Immunomedics, AFP-Cide, en desarrollo por Immunomedics, MyelomaCide, en desarrollo por Immunomedics, LkoCide, en desarrollo por Immunomedics, ProstaCide, en desarrollo por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 en desarrollo por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 en desarrollo por Medarex, MDX-070 en desarrollo por Medarex, MDX-018 en desarrollo por Medarex, Osidem® (IDM-1), y un anticuerpo anti-Her2 en desarrollo por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα en desarrollo por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina en desarrollo por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpo anti-molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (CD54) en desarrollo por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) en desarrollo por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 en desarrollo por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-interferón gamma en desarrollo por Protein Design Labs, Anti-Integrina α5β1, en desarrollo por Protein Design Labs, anti-IL-12, en desarrollo por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM en desarrollo por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech y Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 en desarrollo por Xoma. En otra realización, los productos terapéuticos incluyen KRN330 (Kirin); anticuerpo para huA33 A33 (Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (integrinas alfa V, Centocor); MEDI-522 (integrina alfa Vβ3, Medimmune); volociximab (integrina alfa Vβ1, Biogen/PDL); mAb 216 humano (epítipo glucosilado de linfocitos B (NCI); BiTE MT103 (bispecifico CD19xCD3, Medimmune); 4G7xH22 (bispecifico linfocito BxFcgammaRI, Medarex/Merck KGa); rM28 (bispecifico CD28xMAPG, n.º de patente EP EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (bispecifico CD64xEGFR, Medarex); Catumaxomab (removab) (bispecifico EpCAMx anti-CD3, Trion/Fres); Ertumaxomab (bispecifico HER2/CD3, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRex); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endoglina, Tracon); BMS-663513 (agonista de CD137, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (receptor de fc de CD3, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentics); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52,

Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno escindido, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista de DR4TRAIL-R1, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); 5 Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (Iexatumumab) (agonista de DR5TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbix) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adecatumumab (MT201) (Epcam, Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor de folato a, Morphotech); KW-2871 (gangliósido GD3, Kyowa); MORAb-009 10 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb, Celldex); Trastuzumab (Herceptin) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMAb 2C4) (HER2 (DI), Genentech); apolizumab (cadena beta de HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-IR R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (receptor de similar a Ig de linfocitos citolíticos naturales (KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig 15 Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTβR, Biogen); HuHMG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epitopo de carbohidrato unido en N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), University of California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); Acm CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFRa, Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 ((pan)inhibidor de TGFb (IgG4), Genzyme); 20 Infliximab (Remicade) (TNFa, Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, publicación PCT n.º WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

25 Los ejemplos de anticuerpos parentales biespecíficos útiles incluyen, pero sin limitación, aquellos con un anticuerpo dirigido contra un antígeno de células tumorales y el otro anticuerpo dirigido contra una molécula desencadenante citotóxica tal como anti-FcγRI/anti-CD 15, anti-p185 /FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-linfocitos B malignos (1D10), anti-CD3/anti-p 185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/IdI (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de hormona estimulante de los melanocitos, anti-receptor 30 de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión celular neural (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a pancarcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; anticuerpos biespecíficos con un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tumoral y otro anticuerpo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporin, anti-CD7/anti-saporin, anti-CD38/anti-saporin, anti-ACE/anti-cadena A de la ricina, anti-interferon α (IFN-α)/anti-idiotipo 35 de hibridoma, anti-ACE/anti-alcaloide de la vinca; anticuerpos biespecíficos para la conversión de profármacos activados por enzimas, tales como anti-CD30 / anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco de fosfato de mitomicina a mitomicina alcohol); anticuerpos biespecíficos que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador tisular del plasminógeno (APt), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tipo uroquinasa (APu); anticuerpos biespecíficos para dirigir complejos inmunitarios a receptores de la superficie celular 40 tales como el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)/anti-Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); anticuerpos biespecíficos para su uso en la terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (VHS), anti-complejo receptor de linfocitos T:CD3/anti-virus de la gripe, anti-FcγR/anti-VIH; anticuerpos biespecíficos para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo*, tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-ACE/anti-DPTA, anti-anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; anticuerpos biespecíficos como adyuvantes de vacunas (véase Fanger, M W *et al.*, Crit Rev Immunol. 1992; 12(34): 101-24); y anticuerpos biespecíficos como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-ACE/anti-β-galactosidasa (véase Nolan, O *et R.* O'Kennedy, Biochim Biophys Acta. 1 de agosto de 1990; 1040(1):1-11). Los ejemplos de anticuerpos trispecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

50 En determinadas realizaciones, el anticuerpo que comprende uno o más restos de aminoácido no naturales en posiciones de localización específica tiene una alta identidad de secuencia con cualquier anticuerpo parental descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es sustancialmente idéntico a un anticuerpo parental descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo tiene 55 aproximadamente el 60 % de identidad, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 % de identidad con un anticuerpo parental descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo tiene mayor que aproximadamente el 65 %, mayor que aproximadamente el 70 %, mayor que aproximadamente el 75 %, mayor que aproximadamente el 80 %, mayor que aproximadamente el 85 %, mayor que aproximadamente el 90 % o mayor que aproximadamente el 95 % de identidad con un anticuerpo parental descrito 60 en el presente documento. Los anticuerpos son sustancialmente idénticos si al menos una cadena polipeptídica de un anticuerpo tiene una identidad de secuencia con una cadena polipeptídica correspondiente de otro anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que comprende uno o más restos de aminoácido no naturales en posiciones de localización específica tiene al menos una cadena polipeptídica que tiene mayor que 65 aproximadamente el 65 %, mayor que aproximadamente el 70 %, mayor que aproximadamente el 75 %, mayor que aproximadamente el 80 %, mayor que aproximadamente el 85 %, mayor que aproximadamente el 90 % o mayor que

aproximadamente el 95 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6 a lo largo de al menos un dominio, al menos dos dominios o al menos tres dominios.

Composiciones de anticuerpos

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

10 En determinadas realizaciones, las composiciones de anticuerpos proporcionadas en el presente documento comprenden adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador puede ser un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir transportadores convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se describen en E.W. Martin, 1990, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para la administración a un sujeto humano. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica contendrá una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz del anticuerpo junto con una cantidad adecuada de vehículo, para proporcionar la forma de administración apropiada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

35 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para administración intravenosa. Normalmente, las composiciones adecuadas para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Dichas composiciones, sin embargo, pueden administrarse por una vía distinta de la administración intravenosa.

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

45 Los componentes de la composición farmacéutica se pueden suministrar por separado o mezclarse conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, antes de la administración, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino, de forma que puedan mezclarse los ingredientes antes de la administración.

50 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se suministran como un polvo liofilizado seco esterilizado que puede reconstituirse a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos se suministran como un concentrado sin agua. En algunas realizaciones, el anticuerpo se suministra como un polvo liofilizado seco estéril en una dosificación unitaria de al menos 0,5 mg, al menos 1 mg, al menos 2 mg, al menos 3 mg, al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 30 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, o al menos 75 mg.

60 En otra realización, la composición farmacéutica se suministra en forma líquida. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en forma líquida y está sustancialmente exenta de tensioactivos y/o sales inorgánicas. En algunas realizaciones, el anticuerpo se suministra como una forma líquida en una dosificación unitaria de al menos 0,1 mg/ml, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 3 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml o al menos 60 mg/ml.

65 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una forma salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio,

amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

En uso terapéutico, el facultativo determinará la posología más apropiada de acuerdo con un tratamiento preventivo o curativo y de acuerdo con la edad, el peso, la fase de la infección y otros factores específicos del sujeto a tratar.

5 En determinadas realizaciones, las dosis son de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg por día para un adulto, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 250 mg por día o de aproximadamente 10 a 50 mg por día para un adulto. En determinadas realizaciones, las dosis son de aproximadamente 5 a aproximadamente 400 mg por día o de 25 a 200 mg por día por adulto. En determinadas realizaciones, también se contemplan tasas de dosis de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg por día.

10

Métodos de uso para terapia o profilaxis

Determinados anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden usarse para el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o afección que el experto en la materia considere adecuada. En general, un método de tratamiento o prevención abarca la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del anticuerpo o composición de anticuerpo a un sujeto que lo necesite, para tratar o prevenir la enfermedad o afección.

15

Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o composición es una cantidad que es eficaz para reducir la gravedad, la duración y/o los síntomas de una enfermedad o afección particular. La cantidad del anticuerpo o composición que será terapéuticamente eficaz en la prevención, abordaje, tratamiento y/o mejoría de una enfermedad particular se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. La cantidad precisa del anticuerpo o composición a administrar dependerá, en parte, de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad o afección particular, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto.

20

25

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del anticuerpo proporcionado en el presente documento está entre aproximadamente 0,025 mg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal de un sujeto humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se administra a un sujeto humano en una cantidad de aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 950 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 900 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 850 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 800 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 700 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 650 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 600 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 550 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 450 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 95 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 85 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal o menos o aproximadamente 65 mg/kg de peso corporal o menos.

30

35

40

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de anticuerpo proporcionado en el presente documento está entre aproximadamente 0,025 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal de un sujeto humano. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un anticuerpo de la composición farmacéutica proporcionada en el presente documento es de aproximadamente 0,025 mg/kg o menos, aproximadamente 0,05 mg/kg o menos, aproximadamente 0,10 mg/kg o menos, aproximadamente 0,20 mg/kg o menos, aproximadamente 0,40 mg/kg o menos, aproximadamente 0,80 mg/kg o menos, aproximadamente 1,0 mg/kg o menos, aproximadamente 1,5 mg/kg o menos, aproximadamente 3 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 15 mg/kg o menos, aproximadamente 20 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 30 mg/kg o menos, aproximadamente 35 mg/kg o menos, aproximadamente 40 mg/kg o menos, aproximadamente 45 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o aproximadamente 60 mg/kg o menos.

45

50

La composición farmacéutica del método puede administrarse usando cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, por administración subcutánea o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intramuscular.

55

60

Métodos de uso para detección o diagnóstico

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden usarse para la detección de cualquier diana o para el diagnóstico de cualquier enfermedad o afección que el experto en la materia considere adecuada. Los métodos abarcan la detección de la unión de un anticuerpo a un antígeno diana en la ubicación apropiada, por

65

ejemplo, el cuerpo, tejido o célula apropiados. En los métodos, la formación de un complejo entre el anticuerpo y el antígeno se puede detectar mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen ensayos que utilizan reactivos secundarios para la detección, ELISA e inmunoprecipitación, y ensayos de aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos se proporciona, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612, el documento WO96/13590 para Maertens y Stuyver, Zrein *et al.* (1998) y el documento WO96/29605.

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

En el presente documento se proporcionan adicionalmente kits para la detección o el diagnóstico. Los kits a modo de ejemplo comprenden uno o más anticuerpos proporcionados en el presente documento junto con uno o más reactivos útiles para la detección de un complejo entre el uno o más anticuerpos y sus antígenos diana.

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la materia, sin limitación. Las técnicas útiles para la preparación incluyen síntesis *in vivo*, por ejemplo con ARNt modificado y ARNt sintasa, síntesis sin células, por ejemplo con ARNt modificado y ARNt sintasa, síntesis de polipéptidos en fase sólida y síntesis de polipéptidos en fase líquida. En esta sección y en los ejemplos a continuación se describen técnicas a modo de ejemplo.

En determinados métodos, el anticuerpo se traduce y/o transcribe a partir de uno o más polinucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan polinucleótidos que tienen la capacidad de codificar los anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos no naturales posiciones de localización específica en una o más cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos comprenden un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido en la posición del polinucleótido correspondiente a la posición de localización específica del polipéptido para el aminoácido no natural. Los ejemplos de tales codones incluyen codones de terminación, codones de 4 pb, codones de 5 pb y similares. Normalmente, la mezcla de reacción comprende una ARNt sintasa que tiene la capacidad de producir los ARNt que complementan (suprimen) a dicho codón. Estos ARNt supresores se unen a los aminoácidos no naturales para facilitar su incorporación en el polipéptido en el sitio del codón supresor.

Los anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, para expresar tales polinucleótidos para incorporar aminoácidos no naturales en posiciones de localización específica de una cadena polipeptídica. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 7.045.337 y 7.083.970, las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas n.º 2008/0317670, US 2009/0093405, US 2010/0093082, US 2010/0098630, US 2008/0085277 y en las publicaciones de patente internacional n.º WO 2004/016778 A1 y WO 2008/066583 A2.

En determinadas realizaciones, se puede preparar un anticuerpo en una mezcla de reacción sin células que comprende al menos un ARNt aminoacilado ortogonal con un aminoácido no natural, en que las bases del ARNt ortogonal se emparejan con un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido, por ejemplo, un codón de terminación; un codón de 4 pb, etc. La mezcla de reacción también comprende una ARNt sintasa que tenga la capacidad de aminoacilar el ARNt ortogonal con un aminoácido no natural. Habitualmente, la ARNt sintasa ortogonal, que es susceptible a la degradación por proteasas presentes en los extractos de células bacterianas, se sintetiza de forma exógena y se añade a la mezcla de reacción antes del inicio de la síntesis del polipéptido. El ARNt ortogonal se puede sintetizar en las células bacterianas a partir de las que se obtiene el extracto celular, se puede sintetizar *de novo* durante la reacción de síntesis del polipéptido o se puede añadir de forma exógena a la mezcla de reacción.

En determinadas realizaciones, se añaden de forma opcional a la mezcla de reacción componentes que afectan la inserción de aminoácidos no naturales y la inserción o el plegamiento de proteínas. Dichos componentes incluyen concentraciones elevadas de factores de traducción para minimizar el efecto del factor de liberación 1 y 2, y para optimizar adicionalmente las concentraciones de los componentes ortogonales. Se puede añadir de forma exógena proteínas chaperonas (Sistema Dsb de oxidorreductasas e isomerasas, GroES, GroEL, DNAJ, DNAK, Skp, etc.) a la mezcla de reacción o se pueden sobreexpresar en las células de origen utilizadas para preparar el extracto celular. Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala, a pequeña escala o pueden hacerse múltiples para realizar una pluralidad de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas utilizarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos y poder aislar el producto final como parte del procedimiento. Los sistemas discontinuos también son de interés, en los que se pueden introducir reactivos adicionales para prolongar el período de la síntesis activa. Un reactor se puede ejecutar en cualquier modo, tal como discontinuo, discontinuo extendido, semidiscontinuo, semicontinuo, discontinuo alimentado y continuo, y que se seleccionará en conformidad con el fin

de la solicitud. Las reacciones pueden ser de cualquier volumen, ya sea a pequeña escala, habitualmente al menos de aproximadamente 1 µl y no más de aproximadamente 15 µl, o en una reacción a mayor escala, en la que el volumen de reacción es al menos de aproximadamente 15 µl, más habitualmente de al menos aproximadamente 50 µl, más habitualmente de al menos aproximadamente 100 µl, y puede ser de 500 µl, 1000 µl o más. En principio, las reacciones se pueden realizar a cualquier escala siempre que se suministre suficiente oxígeno (u otro aceptor de electrones) cuando sea necesario.

Los métodos útiles para la síntesis en los que al menos un aminoácido no natural se introduce en la cadena polipeptídica durante la elongación incluyen, pero sin limitación: (I) la adición de sintasa ortogonal exógena purificada, un aminoácido no natural y ARNt ortogonal a la reacción sin células, (II) la adición de sintasa ortogonal exógena purificada y un aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero transcribiéndose el ARNt ortogonal durante la reacción sin células, (III) la adición de sintasa ortogonal exógena purificada y un aminoácido no natural a la mezcla de reacción, pero sintetizándose el ARNt ortogonal mediante el organismo de origen del extracto celular. En determinadas realizaciones, los componentes ortogonales se dirigen mediante promotores regulables, de forma que puedan controlarse los niveles de síntesis, aunque se pueden utilizar otras medidas, tal como controlar el nivel de los moldes de ADN pertinentes mediante adición o digestión específica.

En algunas realizaciones, se utiliza un sistema de expresión sin células bacterianas para producir variantes de proteínas o péptidos con aminoácidos no nativos (AAnn). El uso de extractos bacterianos sin células para la síntesis de proteínas *in vitro* ofrece varias ventajas con respecto a los métodos convencionales de expresión de proteínas *in vivo*. Los sistemas sin células pueden dirigir la mayoría, si no todos, los recursos metabólicos de la célula hacia la producción exclusiva de una proteína. Además, la falta de componentes de la pared y de la membrana celulares *in vitro* es ventajosa, ya que permite el control del entorno de la síntesis. Sin embargo, las proteínas bacterianas que inhiben la síntesis de proteínas pueden disminuir la eficacia de los extractos sin células, ya sea directa o indirectamente. Por lo tanto, la inactivación de proteínas no deseadas que disminuyen la eficacia de la síntesis de proteínas debería aumentar el rendimiento de las proteínas deseadas en los extractos sin células. Por ejemplo, la inactivación de proteínas que disminuyen la eficacia de la síntesis de proteínas debería aumentar el rendimiento de los polipéptidos que tienen aminoácidos no nativos incorporados en un resto de aminoácido definido. La introducción de AAnn en polipéptidos es útil para aumentar la diversidad biológica y la función de las proteínas. Un enfoque para producir polipéptidos que tengan un AAnn incorporado en un resto de aminoácido definido es el uso de un AAnn, CUA ortogonal aminoacilado que contiene ARNt para la introducción del AAnn en el polipéptido naciente en un codón ámbar (de finalización) durante la traducción de la proteína. Sin embargo, la incorporación del AAnn en un codón ámbar puede ser inhibida por el complejo de terminación bacteriano nativo, que normalmente reconoce el codón de finalización y termina la traducción. El factor de liberación 1 (RF1) es una proteína del complejo de terminación que facilita la terminación de la traducción al reconocer el codón ámbar en una secuencia de ARNm. El reconocimiento de RF1 del codón de finalización ámbar puede inducir productos de truncamiento prematuros en el sitio de incorporación de los aminoácidos no nativos y, por lo tanto, reducir el rendimiento proteico. Por lo tanto, la atenuación de la actividad de RF1 puede aumentar la incorporación de AAnn a las proteínas recombinantes.

Anteriormente se ha demostrado que la incorporación de AAnn se puede aumentar mediante la atenuación de la actividad RF1 de 3 modos: 1) neutralizando la inactivación por anticuerpos de RF1; 2) genosuprimiendo a RF1 genómica (en una cepa reforzada con RF2) y 3) eliminando RF1 de manera específica de localización usando una cepa técnicamente diseñada para expresar RF1 que contiene una etiqueta proteica para la eliminación mediante cromatografía de afinidad (dominio de unión a quitina y etiqueta de His). Otro método para inactivar a RF1 comprende la introducción de sitios de escisión proteolítica en la secuencia de aminoácidos de RF1. Los sitios de escisión no son accesibles para la proteasa durante el crecimiento de las células bacterianas, pero la proteasa los escinde cuando las células bacterianas se lisan para producir un extracto sin células. Por lo tanto, el rendimiento de los polipéptidos de longitud completa que tienen un AAnn incorporado en un codón ámbar aumenta en los extractos de células bacterianas que expresan tales variantes modificadas de RF1.

En algunas realizaciones, para producir anticuerpos que comprenden un aminoácido no natural, se necesita un molde de ácido nucleico. Los moldes para la síntesis de proteínas sin células pueden ser de ARNm o ADN. El molde puede comprender secuencias de cualquier anticuerpo particular de interés y puede codificar un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de cualquier longitud del mismo. Los ácidos nucleicos que sirven como moldes de síntesis de proteínas se obtienen opcionalmente de una fuente natural, o pueden ser sintéticos o recombinantes. Por ejemplo, los ADN pueden ser ADN recombinantes, por ejemplo, plásmidos, virus o similares.

En algunas realizaciones, una vez producido el molde de ácido nucleico de un anticuerpo, el molde se utiliza para sintetizar el anticuerpo en un sistema de traducción sin células. Por ejemplo, el molde se puede añadir a un lisado celular en condiciones suficientes para traducir el molde a una proteína. El lisado celular puede ser de células bacterianas o de células eucariotas. La proteína expresada se puede purificar después usando métodos conocidos en la técnica, como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, se usa un sistema de traducción (por ejemplo, un sistema de síntesis de proteínas *in vitro*) para producir el anticuerpo con uno o más AAnn incorporados en el mismo. Un sistema de traducción a modo de ejemplo comprende un extracto sin células, un lisado de células o un sistema de traducción reconstituido, junto con

el molde de ácido nucleico para la síntesis del polipéptido o la proteína que se desee, que tiene aminoácidos no nativos en posiciones preseleccionadas (definidas). La mezcla de reacción comprenderá adicionalmente monómeros para la macromolécula a sintetizar, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, etc., y los cofactores, enzimas y otros reactivos que son necesarios para la síntesis, por ejemplo, ribosomas, ARNt, polimerasas, factores de transcripción, etc. Además de los componentes anteriores, tales como un extracto sin células, un molde de ácido nucleico y aminoácidos, se pueden añadir a la reacción materiales específicamente necesarios para la síntesis de proteínas. Los materiales incluyen sales, ácido folínico, AMP cíclico, inhibidores de enzimas que degradan proteínas o ácidos nucleicos, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, agentes que ajustan los potenciales de oxidación/reducción, tensioactivos no desnaturizantes, componentes tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc. En la técnica, se conocen bien diversos sistemas de reacción de síntesis sin de células. Véase, por ejemplo, Kim, D. M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 66:180-8 (1999); Kim, D. M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Prog.* 16:385-90 (2000); Kim, D. M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 74:309-16 (2001); Swartz *et al*, *Methods MoL Biol.* 267:169-82 (2004); Kim, D. M. y Swartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 85:122-29 (2004); Jewett, M. C. y Swartz, J. R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:19-26 (2004); Yin, G. y Swartz, J. R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:188-95 (2004); Jewett, M. C. y Swartz, J. R., *Biotechnol. Bioeng.* 87:465-72 (2004); Voloshin, A.M. y Swartz, J. R., *Biotechnol. Bioeng.* 91:516-21 (2005). Las condiciones adicionales para la síntesis sin células de los polipéptidos deseados se describen en el documento WO2010/081110.

En algunas realizaciones, se usa un molde de ADN para dirigir la síntesis de proteínas *in vitro* y se añade la ARN polimerasa a la mezcla de reacción para proporcionar una transcripción potenciada del molde de ADN. Las ARN polimerasas adecuadas para su uso en el presente documento incluyen cualquier ARN polimerasa que funcione en las bacterias de las que se obtenga el extracto bacteriano. En otras realizaciones, se usa un molde de ARN para dirigir la síntesis de proteínas *in vitro* y los componentes de la mezcla de reacción se pueden mezclar entre sí en cualquier orden conveniente, pero preferentemente se mezclan en un orden en que se añade el molde de ARN en último lugar, minimizando de este modo la posible degradación del molde de ARN por parte de las nucleasas.

En algunas realizaciones, se usa un sistema de traducción sin células para producir el anticuerpo con uno o más de los AAnn incorporados en el mismo. La síntesis de proteínas sin células puede aprovechar el poder catalítico de la maquinaria celular. La obtención de rendimientos máximos de proteínas *in vitro* precisa un suministro adecuado de sustratos, por ejemplo, nucleósidos trifosfato y aminoácidos, un entorno homeostático, estabilidad del catalizador y la eliminación o evitación de subproductos inhibidores. La optimización de las reacciones de síntesis *in vitro* se beneficia de la recreación del estado *in vivo* de un organismo en rápido crecimiento. En algunas realizaciones de la invención, la síntesis sin células se realiza, por lo tanto, en una reacción en que se activa la fosforilación oxidativa. En la patente de los Estados Unidos n.º 7.338.789 se describen detalles adicionales.

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

En determinadas realizaciones, la ARNt sintasa se sintetiza de forma exógena y se añade a la mezcla de reacción sin células. En determinadas realizaciones, la mezcla de reacción se prepara a partir de células bacterianas en las que se ha inactivado ompT o está naturalmente inactivo. Se cree que ompT degrada los componentes de la mezcla de reacción, incluyendo la ARNt sintetasa.

Además de los componentes anteriores, tales como un extracto sin células, un molde genético y aminoácidos, se pueden añadir a la reacción materiales específicamente necesarios para la síntesis de proteínas. Estos materiales incluyen sales, ácido folínico, AMP cíclico, inhibidores de enzimas que degradan proteínas o ácidos nucleicos, inhibidores o reguladores de la síntesis de proteínas, agentes que ajustan el potencial (o potenciales) de oxidación/reducción, tensioactivos no desnaturizantes, componentes tampón, espermina, espermidina, putrescina, etc.

Las sales incluyen, preferentemente, sales de potasio, magnesio y amonio (por ejemplo, ácido acético o ácido glutámico). Una o más de tales sales pueden tener un aminoácido alternativo como contra anión. Existe una interdependencia entre las especies iónicas para una concentración óptima. Estas especies iónicas normalmente se optimizan con respecto a la producción de proteínas. Cuando se cambia la concentración de un componente particular del medio de reacción, la de otro componente puede cambiarse en consecuencia. Por ejemplo, las concentraciones de varios componentes, tal como los nucleótidos y los compuestos de fuente de energía, pueden ajustarse simultáneamente en conformidad con el cambio en los de otros componentes. Además, los niveles de concentración de los componentes en el reactor pueden variar con el tiempo. El ajustador del potencial de

oxidación/reducción puede ser ditioneitol, ácido ascórbico, glutatión y/o sus formas oxidadas.

5 En determinadas realizaciones, la reacción puede proceder en un modo de diálisis, en un modo discontinuo de diafiltración, en un modo discontinuo alimentado de un modo de funcionamiento semicontinuo. En determinadas realizaciones, se puede suministrar al reactor una solución de alimentación a través de una membrana o a través de una unidad de inyección. El anticuerpo sintetizado puede acumularse en el reactor seguido de un aislamiento o purificación después de que haya acabado el procedimiento del sistema. Las vesículas que contienen el anticuerpo también pueden aislarse de forma continua, por ejemplo, por adsorción por afinidad a partir de la mezcla de reacción ya sea *in situ* o en un bucle de circulación a medida que el fluido de reacción se bombea más allá de la matriz de adsorción.

10 Durante la síntesis de proteínas en el reactor, los medios de aislamiento de proteínas para aislar selectivamente la proteína deseada pueden incluir una unidad empaquetada con partículas recubiertas con moléculas de anticuerpo u otras moléculas para adsorber la proteína sintetizada deseada. Preferentemente, los medios de aislamiento de proteínas comprenden dos columnas para el uso alterno.

El anticuerpo resultante se puede purificar o aislar mediante técnicas convencionales. Las técnicas a modo de ejemplo se proporcionan a continuación en los ejemplos.

20 *Métodos de ensayo*

Los anticuerpos pueden someterse a ensayo en cuanto a su actividad esperada, o en cuanto a una nueva actividad, de acuerdo con cualquier ensayo evidente para los expertos en la materia. Puede someterse a ensayo la actividad del anticuerpo resultante en un ensayo funcional o mediante la cuantificación de la cantidad de proteína presente en un ensayo no funcional, por ejemplo, inmunotinción, ELISA, cuantificación en gel teñido con coomasie o plata, etc., y determinando la relación de proteína biológicamente activa con respecto a la proteína total.

30 La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción se puede medir de diversos modos. Un método se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular a traducir. Un ejemplo de un ensayo para medir la actividad de la proteína es un sistema de ensayo de luciferasa, o un sistema de ensayo de clorofenicol acetil transferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida a partir de la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que está inactiva debido al plegamiento incorrecto de la proteína o la falta de otras modificaciones postraduccionales necesarias para la actividad de la proteína.

35 Otro método para medir la cantidad de proteína producida en las reacciones de transcripción y traducción acopladas *in vitro* es realizar las reacciones utilizando una cantidad conocida de aminoácido radiomarcado tal como ³⁵S-metionina, ³H-leucina o ¹⁴C-leucina, y posteriormente medir la cantidad de aminoácido radiomarcado incorporado en la proteína recién traducida. Los ensayos de incorporación medirán la cantidad de aminoácidos radiomarcados en todas las proteínas producidas en una reacción de traducción *in vitro* incluyendo productos proteicos truncados. La proteína radiomarcada se puede separar adicionalmente en un gel de proteínas, y mediante autorradiografía confirmar que el producto tiene el tamaño apropiado y que no se han producido productos proteicos secundarios.

45 **Ejemplos**

Como se usa en el presente documento, los símbolos y convenciones utilizados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos, independientemente de si una abreviatura particular se define específicamente, concuerdan con los usados en la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Biological Chemistry.

50 Para todos los siguientes ejemplos, se pueden utilizar métodos convencionales de análisis y purificación conocidos por los expertos en la materia. A menos que se indique otra cosa, todas las temperaturas se expresan en °C (grados centígrados). Todos los métodos se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa.

55 **Ejemplo 1**

Síntesis de anticuerpos a modo de ejemplo que contienen aminoácidos no naturales y conjugación con un agente citotóxico a modo de ejemplo

60 El siguiente ejemplo describe anticuerpos a modo de ejemplo que contienen aminoácidos no naturales en posiciones definidas, junto con métodos para su construcción y expresión. Los anticuerpos se evaluaron en cuanto a su expresión, la eficacia de supresión, la eficacia de conjugación con un agente destructor de células, la unión a células y la destrucción de células, como se expone a continuación. En este ejemplo, los anticuerpos a modo de ejemplo están basados en el anticuerpo parental trastuzumab (patentes de Estados Unidos n.º 6.165.464 y 2006/0018899 A1; Carter *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10:4285-4289).

65 En primer lugar, se fabricaron construcciones que incorporaban un codón ámbar TAG en una posición definida en la

cadena pesada de trastuzumab. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida utilizando como molde de ADN un plásmido pYD que contiene la región codificante de trastuzumab con una etiqueta de (His)₆ C-terminal (SD02005) y oligonucleótidos sintéticos (Eurofins MWS Operon; Huntsville, AL) que contenían las mutaciones de interés tanto en la dirección sentido como antisentido. Se añadieron oligonucleótidos de cada mutación al molde de ADN y a la polimerasa PHUSION® (New England Biolabs; Ipswich, MA) hasta un volumen final de 20 µl. La concentración final de cada componente fue de 0,16 µM de cada oligonucleótido, ADN molde 0,5 ng/µl, polimerasa PHUSION® 0,02 U/µl en tampón HF que contenía MgCl₂ 1,5 mM y dNTP 200 µM. La mezcla se incubó a 98 °C 5 min, 18 ciclos de PCR (98 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 4 min), 10 min a 72 °C y se reservó a 4 °C. Se añadió DpnI (New England Biolabs; Ipswich, MA) a la mezcla a una concentración final de 0,6 U/µl y se incubó durante 37 °C 1 h para digerir el ADN parental.

Después, se transformaron 5 µl de cada mezcla en 50 µl de células *E. coli* químicamente competentes con una placa MultiShot™ de 96 pocillos TOP10 de acuerdo con el procedimiento del fabricante (Invitrogen; Carlsbad, CA). Las células transformadas se recuperaron en 200 µl de SOC (Invitrogen; Carlsbad, CA) a 37 °C durante 1 hora y se sembraron en placas en agar Luria-Bertani (LB) complementado con 50 µg/ml de kanamicina (Teknova; Hollister, CA). Después de 24 horas a 37 °C, se recogieron colonias en 200 µl de LB con glicerol al 7,5 % y kanamicina 50 µg/ml, y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Se utilizaron 20 µl de cultivo para una amplificación por círculo rodante (ACR) y se secuenció mediante extensión del cebador usando los cebadores T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG 3' - SEQ ID NO: 7) y T7 term (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG3' - SEQ ID NO: 8). La secuencia se analizó utilizando el programa informático SEQUENCHER® (Gene Codes Corp; Ann Arbor, MI) y los clones que contenían mutaciones se seleccionaron y dispusieron en placas de 96 pocillos. Se cultivaron durante una noche cultivos de las variantes seleccionadas y se utilizaron para preparar ADN plasmídico utilizando el protocolo convencional de minipreparación en pocillos de 96 pocillos de acuerdo con el fabricante (Qiagen; Germantown, MD). La concentración del ADN de las minipreparaciones se midió utilizando la absorbancia a 260 nm (y 280 nm).

Después, se expresaron las variantes en una reacción de síntesis de proteínas sin células, como se describe a continuación en Zawada *et al.*, 2011, *Biotechnol. Bioeng.* 108(7)1570-1578 con las modificaciones descritas a continuación. Además, se preparó trastuzumab no sustituido como control. Los extractos sin células se trataron con yodoacetamida 50 µM durante 30 minutos a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contenía todos los otros componentes excepto el ADN de la cadena pesada de las variantes de interés. Las reacciones sin células se iniciaron mediante la adición de ADN plasmídico de variantes de ADN de la cadena pesada y se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 450 rpm en placas de 96 pocillos profundos. La reacción se incubó adicionalmente a 4 °C durante 5 h. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas fue de 30 % de extracto celular, para-azido fenilalanina (pAzF) 1 mM (RSP Amino Acids), ARNt supresor ámbar de *M jannaschii* 0,125 mg/ml, aminoacil ARNt sintasa específica de pAzF de *M jannaschii* (FRS) 0,37 mg/ml, GSSG 2 mM, PDI 0,29 mg/ml (Mclab), DsbC de *E. coli* 100 µg/ml, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1,2 mM, 0,86 mM de cada GMP, UMP y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0,5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermina 1,5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARNP de T7 100 nM, ADN de la cadena ligera de trastuzumab 2 µg/ml, ADN de la cadena pesada de trastuzumab-(His)₆ 8 µg/ml. Cada variante de trastuzumab se produjo en una escala de 1 ml en placas de 96 pocillos profundos con duplicados. Se utilizaron un total de tres placas para expresar las variantes, cada una comparada con la expresión de un trastuzumab no sustituido para normalizar la expresión entre placas. Cabe destacar que todas las variantes de trastuzumab así producidas eran no glucosiladas.

Para monitorear la síntesis de proteínas, se eliminó una porción de cada reacción de síntesis de proteínas sin células y se enriqueció con 1-[U-¹⁴C]-leucina al 3,33 % (v/v) (300 mCi/mmol); GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Se determinó la supresión del codón ámbar en distintos sitios de la cadena pesada por autorradiografía de [¹⁴C] de geles reductores SDS-PAGE. La cadena pesada de longitud completa de trastuzumab y las variantes de cadena pesada de trastuzumab suprimida corrieron a 50 kD en SDS-PAGE. Las variantes de trastuzumab sin supresión (truncadas) corrieron hasta un peso molecular más bajo. La supresión de ámbar en la cadena pesada se determina mediante:

$$\text{supresión} = \frac{\text{intensidad de banda de la variante de TAG de la cadena pesada suprimida}}{\text{intensidad de la banda de la cadena pesada de tipo silvestre}}$$

La intensidad de la banda fue determinada por ImageQuant (Amersham Biosciences Corp.; Piscataway, NJ). Cabe destacar que este ensayo en gel de ¹⁴C no se puede usar para evaluar las supresiones para las variantes de TAG de la cadena pesada desde la posición de 425 (numeración del índice de la UE) hasta el extremo C, dado que las variantes truncadas no se pueden distinguir del producto de longitud completa.

Después de la síntesis, cada reacción de 1 ml se diluyó con 1 ml de PBS a pH 7,4. La mezcla se centrifugó a 5000x g a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se capturó con IMAC Phytip que contenía 40 µl de resina (PhyNexus, Inc.; San Jose, CA) pipeteando arriba y abajo lentamente 4 veces a un caudal de 4,2 µl/min. La resina se lavó con 925 µl de tampón de unión IMAC (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) pipeteando arriba y abajo dos veces a un caudal de 8,3 µl/min. Este procedimiento se repitió una vez con 925 µl adicionales de tampón de unión IMAC.

La proteína unida se eluyó con 250 µl de tampón de elución IMAC (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM) pipeteando arriba y abajo 4 veces a un caudal de 4,2 µl/min. Dado que la etiqueta de (his)6 de la construcción es C-terminal, este procedimiento permite el aislamiento de la proteína de longitud completa. Para cuantificar las variantes después de la purificación, las muestras purificadas por IMAC se mezclaron con un tampón de carga de gel 2x (Bio-Rad n.º 161-0737), se resolvieron mediante un gel Stain-Free™ al 4-15 % (Bio-Rad Criterion™ TGX n.º 567-8085). Las muestras no se calentaron antes de cargarlas en los pocillos del gel. Las bandas de proteína se visualizaron y cuantificaron mediante el sistema Bio-Rad Gel Doc EZ utilizando el programa informático Image Lab (v3). Las intensidades de banda de las muestras se determinaron basándose en los patrones de masa de HERCEPTIN® cargados en el mismo gel.

A continuación, las variantes de trastuzumab se conjugaron con un agente citotóxico a modo de ejemplo, MMAF, usando un reactivo de ciclooctina retringida. En resumen, se disolvió DBCO-MMAF (la estructura se muestra como la Figura 1; ACME Bioscience; Palo Alto, CA) en DMSO a una concentración final de 5 mM. El compuesto se diluyó con PBS a 1 mM y después se añadió a las variantes de trastuzumab-(His)6 en tampón de elución IMAC hasta la concentración final de fármaco de 100 µM. La mezcla se incubó a TA (20 °C) durante 17 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de azida sódica a una concentración final de 100 mM y el tampón se cambió utilizando placas de Zeba (Thermo Scientific; Waltham, MA) equilibradas en PBS 1X. El filtrado se pasó después a través de una placa MUSTANG® Q (Pall Corp.; Port Washington, NY) para eliminar endotoxina.

Ejemplo 2

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo

Se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) para cuantificar las muestras y determinar las relaciones de fármaco-anticuerpo de los conjugados de fármaco-variante de trastuzumab de la siguiente manera. Las muestras y los patrones se diluyeron 1:2 en sulfato de amonio 3 M (EMD Chemical), fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 (Mallinckrodt) preparado en agua MilliQ. Un sistema de HPLC con bomba binaria Agilent 1100 se equipó con una columna de LLC TSK-gel Butyl-NPR® (4,6 mm x 3,5 cm) de Tosoh Bioscience LLC con una temperatura de compartimiento de la columna de 30 °C. La fase móvil A fue fosfato de amonio 1,5 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. La fase móvil B fue fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 en agua:Alcohol isopropílico (Honeywell) 80:20. La fase móvil se suministró a un caudal de 1,0 ml/minuto. La separación se realizó con un gradiente lineal del 15 % de fase móvil B al 100 % de fase móvil B en 10 minutos. Los datos de UV se adquirieron a 210 y 280 nm. Las áreas de los picos se cuantificaron utilizando el programa informático Chemstation (Agilent) y se calculó la Relación de fármaco con respecto a anticuerpo (RFA) a partir del porcentaje del área total del pico.

Para evaluar la unión de las variantes de trastuzumab conjugadas, se realizó un ensayo de unión a células que expresan HER2 de la siguiente manera. La unión de las variantes de conjugado purificadas a HER2 en células SKBR3, que sobreexpresan el producto del gen HER2/c-erb-2, con más de 1,5 millones de copias de receptores por célula (ATCC n.º HTB-30, Manassas, VA) se comparó con Herceptin® con calidad clínico, trastuzumab no glucosilado producido por síntesis de proteínas sin células o IgG1 de suero humano como control negativo (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Las células SKBR3 se cultivaron en DMEM:F-12 de Ham (50:50), alto contenido de glucosa (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin calcio y magnesio, se recogieron con HYQ@TASE™ (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Se incubaron un total de 200.000 células por muestra en un volumen total de 10 µl con diluciones seriadas de una variante de trastuzumab conjugada, HERCEPTIN® de calidad clínica o trastuzumab no glucosilado preparado en 10 µl de tampón de FACS (tampón DPBS complementado con seroalbúmina bovina al 1 %). Las células más anticuerpo o ADC se incubaron durante 60 minutos en hielo. Se utilizaron como controles células no teñidas, IgG1 humana (control de isotipo) y anticuerpo secundario (cabra anti-IgG humana). Las células se lavaron dos veces con tampón de FACS enfriado en hielo y se incubaron con cualquiera de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana marcado con Alexa 647 5 µg/ml (Invitrogen; Carlsbad, CA) en hielo durante 1 hora. Todas las muestras se lavaron utilizando un tampón de FACS y se analizaron utilizando un sistema FACS Calibur de BD (BD Biosciences; San José, CA).

Las intensidades medias de fluorescencia se ajustaron utilizando un análisis de regresión no lineal con una ecuación de un sitio de unión específica utilizando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, programa informático; San Diego, CA). Los datos se expresaron como IMF relativo frente a la concentración de anticuerpo o variante de anticuerpo en µg/ml.

A continuación, Los efectos del trastuzumab conjugado sobre la destrucción celular se midieron con un ensayo de proliferación celular de la siguiente manera. Se obtuvieron las SKBR3 y MDA-MB-468 de la ATCC y se mantuvieron en DMEM:F-12 de Ham (50:50), alta glucosa (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin calcio y magnesio, se recogieron con HYQ@TASE™

(Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Se sembraron un total de 10^3 células en un volumen de 40 μ l en una placa de poliestireno blanco de fondo plano de 96 pocillos con la mitad de la superficie. Se permitió que las células se adhirieran durante una noche a 37 °C en un incubador con CO₂. Las variantes de ADC se formularon a una concentración 2x en medio DMEM/F12 y se filtraron a través de placas de filtro MultiScreen^{HTS} de 96 pocillos (Millipore; Billerica, MA). Se añadieron a los pocillos de tratamiento las variantes de trastuzumab conjugado esterilizadas con filtro, HERCEPTIN o trastuzumab no glucosilado y las placas se cultivaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 120 horas. Para la medición de la viabilidad celular, se añadieron 80 μ l de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp.; Madison, WI) a cada pocillo, y se procesaron las placas según las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad utilizando células no tratadas como controles. Los datos se ajustaron con un análisis de regresión no lineal, usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros de pendiente variable para log(inhibidor) frente a la respuesta, usando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, programa informático; San Diego, CA). Los datos se expresaron como la viabilidad celular relativa, el % de contenido de ATP frente a la dosis de ADC en μ g/ml.

Los resultados de estos experimentos de caracterización se presentan en las **Tablas 1, 2, y 3** (placas 1, 2 y 3, respectivamente). En las Tablas, se muestran las siguientes propiedades de las variantes: la jerarquía y la concentración de la proteína producida, la eficacia de la expresión del producto de longitud completa en comparación con el tipo silvestre (eficacia de supresión), la capacidad de unirse a las células que expresan HER2, la relación fármaco-anticuerpo (expresada como el número de agentes citotóxicos por anticuerpo), un comentario con respecto al perfil de CIH y la CI₅₀ observada en el ensayo de destrucción de células descrito anteriormente. En los comentarios con respecto al ensayo de CIH, pico único corresponde a un perfil que se resolvió bien como un único pico (un ejemplo de tal perfil se muestra en la **Figure 2**), NBR corresponde a un perfil mal resuelto (un ejemplo de tal perfil se muestra en **Figure 3**), y BR corresponde a un perfil de CIH bien resuelto (un ejemplo de tal perfil se muestra en la **Figure 4**). Varias de las variantes que presentaron un perfil de pico único también presentaron una potente destrucción, lo que indica que la variante sí se conjugó con el fármaco, pero no se resolvió en la columna de CIH.

En general, las variantes preferentes presentan una CI₅₀ de aproximadamente 20 ng/ml o inferior, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 10 ng/ml, e incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 5 ng/ml. Preferentemente, las variantes están en el 50 % superior de la expresión, e incluso más preferentemente, están en el 25 % superior de la expresión. Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,0. Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando las posiciones V005, A023, G042, G065, S074, A084, A118, S119, S132, S134, T135, S136, G137, G138, T139, T155, S160, A162, S165, A172, L174, S176, S177, S191, G194, S219, P238, S239, F241, F243, K246, E356, M358, K360, V262, V264, D265, S267, H268, E269, D270, P271, E272, K274, F275, Y278, D280, G281, V282, E283, N286, T289, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, T299, Y300, R301, V303, V305, K317, K320, S324, K326, A327, P329, A330, I332, E333, K334, T335, S337, A339, R344, R355, T359, L398, S375, S383, N384, Q386, N389, K392, G420, K340, Q342, F404, Q438, N421 e Y436. Incluso más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando las posiciones V005, A023, S074, A084, A118, S119, S132, S134, T135, S136, G137, T139, S160, A162, S165, A172, S191, G194, S239, F241, K246, S267, H268, E269, D270, P271, E272, K274, F275, D280, G281, V282, E283, N286, T289, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, T299, Y300, R301, V303, V305, K317, K320, S324, K326, A327, P329, L398, S375, Q386, N389, K392, G420, K340, Q342, Q438 e N421. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando las posiciones V005, **A023**, A084, A118, S119, S132, S134, S136, G137, S160, A162, A172, S239, F241, S267, E269, D270, P271, E272, V282, N286, R292, E293, Y296, S298, P329, A330, K334, T335, K340, R355, T359, Q386, N389, F404, G420, N421, Q438 e Q342. Las variantes con un aminoácido no natural reemplazando las posiciones V005, A084, A118, S132, S136, S239, E293, K334, R355, Q342, T359 y N389, se identificaron como particularmente preferentes.

Además, se observó que la expresión, la eficacia de supresión, la eficacia de conjugación, la unión a células y la destrucción de células, no era predecible basándose en la estructura cristalina del Fc publicada. Por ejemplo, no se predeciría que E293 y K334 aceptaran la sustitución por un derivado de fenilalanina aromática basándose en sus posiciones dentro de la estructura Fc, sin embargo, ambos se expresan bien y son potentes destructores, con valores de CI₅₀ de 2,7 y 3,0 ng/ml, respectivamente. Por el contrario, se predijo que S131 era una posición excelente para la conjugación basándose su disponibilidad en la superficie de la cadena pesada, sin embargo los derivados con sustituciones en esta posición fueron malos conjugadores (RFA de 0,65) y malos destructores (CI₅₀ de 27,1 ng/ml). Por lo tanto, se concluyó que se requería experimentación para identificar sitios óptimos para la expresión, supresión, conjugación y destrucción celular.

Además cabe destacar que se descubrió que los sitios cercanos al sitio de glucosilación unida en N de trastuzumab, N297, eran adecuados para la conjugación. En particular, se descubrió que los sitios desde R292 hasta R301, V303 y V305 presentan propiedades convenientes de destrucción de células y/o conjugación. Fue posible evaluar estos sitios debido a la forma no glucosilada de las variantes de trastuzumab producidas en la reacción de síntesis de proteínas sin células como se describe anteriormente.

Tabla 1

Variante	µg/ml gel IMAC	jerarquía de expresión de ¹⁴ C	µg/ml de ¹⁴ C por SPSC	Eficacia de supresión	Unión a células	RFA	Perfil de CIH	Destrucción de células SKBR3, CI ₅₀ (ng/ml)
S136	151		77	35 %	+	1,54	BR	7,9
S239	161	2	126	57 %	+	ND	Pico único	5,2
A118	156	7	105	48 %	+	1,51	BR	6,5
K246	162	18	75	34 %	+	ND	Pico único	6,6
S119	191	6	109	50 %	+	1,41		7,4
S132	307	1	158	72 %	+	1,58	BR	8
A162	145	17	77	35 %	+	1,38	NBR	8
V005	186	3	124	56 %	+	0,99	NBR	11,5
S191	183	4	114	52 %	+	0,68	BR	13,9
S074	177	9	96	44 %	+	0,78	NBR	9,9
T135	151	8	96	44 %	+	1,03	NBR	10,1
A084	150	5	114	52 %	+	1,28	BR	9
G194	145	11	89	40 %	+	1,1	BR	10,8
T139	138	24	55	25 %	+	1	BR	9,6
A172	130	21	64	29 %	+	1,3	NBR	12,5
S134	124	16	80	36 %	+	1,37	BR	8,9
G137	112	15	83	38 %	+	1,23	BR	9,3
A023	110	19	70	32 %	+	1,33	NBR	9,8
S165	103	20	68	31 %	+	1,04	NBR	9,5
F241	99	13	87	39 %	+	ND	Pico único	8,4
S160	96	14	86	39 %	+	1,34	BR	10
P238	93	22	60	27 %	+	0,47	NBR	12,9
T155	89	10	95	43 %	+	1,19	BR	10,5
V264	88	32	29	13 %	+	ND	Pico único	10,5
S176	74	31	38	17 %	+	0,82	NBR	12,4
G138	72	29	43	20 %	+	1,16	BR	11,2
G065	68	30	40	18 %	+	ND	NBR	9,6
G042	68	26	49	22 %	+	1,12	NBR	13,8
F243	67	22	60	27 %	+	0,12	NBR	10,4
V262	47	36	18	8 %	rt cambiado	ND	NBR	8,2
D265	56	38	13	6 %	+	ND	Pico único	9
L174	52	28	43	20 %	+	1,07	NBR	12,8
S219	26	27	45	20 %	+	1,18	NBR	13,6
S131	76	25	49	22 %		0,65		27,1
G161	43	33	26	12 %		0,97	NBR	87,7
T164	17	35	22	10 %		0,68	NBR	17,5
T195	26	39	14	6 %		1,1	NBR	
S177	23	34	24	11 %	+	0,68	NBR	13,6

Tabla 2

Variante	(ug/ml) gel IMAC	jerarquía de expresión de ¹⁴ C	µg/ml de ¹⁴ C por SPSC	Eficacia de supresión	Unión	RFA	Perfil de CIH	Destrucción de células, CI ₅₀ (ng/ml)
E293	147,6	9	50,7	19 %	+	1,5	BR	2,7
K334	135,7	3	72,5	28 %	+	0,12	Pico único	3
E269	91,2	24	25,3	10 %	+	1,21	BR	1,4
S298	76,9	34	10,6	4 %	+	1,17	NBR	1,9
R292	160,9	7	54,8	21 %	+	ND	Pico único con sh	2,4
E272	111,2	19	32,2	12 %	+	1,05	BR	3
V282	117,4	15	39,7	15 %	+	0,62	NBR	3,1
Y296	142,7	14	39,9	15 %	+	ND	Pico único	3,5
D270	122,6	12	43,8	17 %	+	ND	Pico único	3,9
N286	89,8	20	31,1	12 %	+	0,71	NBR	4
E333	96,1	8	52,6	20 %	+	0,55	NBR	5
S324	88,5	5	59,7	23 %	+	0,3	NBR	5,8
H268	140,2	4	67,6	26 %	+	0,46	NBR	7,9
T289	128,2	11	44	17 %	+	0,26	NBR	8,2
F275	97,3	13	42,4	16 %	+	0,24	NBR	9
I332	98,1	6	54,9	21 %	+	0,88	NBR	10
T335	123,7	2	82,4	32 %	+	0,33	NBR	11,2
P329	61,4	16	36,9	14 %	+	1,05	NBR	3,6
P271	78,2	18	32,3	12 %	+	1,05	BR	4,4
A330	63,6	10	44,7	17 %	+	1,51	NBR	4,5
Y300	124,0	27	17,4	7 %	+	0,13	NBR	4,8
S267	22,1	29	12,4	5 %	+	1,57	NBR	5,1
A327	38,0	22	26,3	10 %	+	0,69	NBR	5,2
G281	31,0	32	11,5	4 %	+	0,27	NBR	5,2
V305	42,8	35	10,2	4 %	+	0,06	NBR	5,5
N297	34,0	37	7,8	3 %	+	0,09	NBR	6,5
Q295	35,6	28	14,2	5 %	+	ND	Pico único	6,8
R301	41,8	39	6	2 %	+	ND	Pico único	7,8
E294	27,9	30	12	5 %	+	0,65	NBR	8,3
E283	32,1	31	11,7	4 %	+	0,24	NBR	8,7
D280	18,0	36	10,1	4 %	+	ND	Único NBR	8,8
K326	35,0	25	24,1	9 %	+	0,54	NBR	9
K317	38,0	33	11,4	4 %	+	0,22	NBR	9,5
K274	36,3	26	19,3	7 %	+	0,45	BR	10,2
T299	20,4	40	4,5	2 %	+	ND	NBR	10,3
V303	93,6	21	29	11 %	+	0,01	NBR	11,1
K320	13,5	38	7,1	3 %	+	0,93	NBR	11,9
Y278	181,6	1	94	36 %	+	ND	BR	22,5

Tabla 3

Variante	$\mu\text{g/ml}$ gel IMAC	jerarquía de expresión de ^{14}C	$\mu\text{g/ml}$ de ^{14}C por SPSC	Eficacia de supresión	Unión	RFA	Perfil de CIH	Destrucción de células, CI_{50} (ng/ml)
R355	86	7	36	21 %	+	1,14	BR	13,8
T359	84	4	39	23 %	+	1,13	BR	7,5
N389	63	6	37	22 %	+	1,54	BR	9,7
S337	56	5	39	23 %	+	ND	No resuelto	6,9
A339	94	2	45	26 %	+	ND	No resuelto	7,7
L398	49	11	24	14 %	+	ND	Pico único	9,4
Q438	56	36	ND	ND	+	1,46	BR	10
N421	27	15	18	11 %	+	1,35	BR	10,5
S375	68	8	27	16 %	+	ND	Pico único	12,3
R344	52	14	20	12 %	+	1,13	BR	16,7
G420	19	18	15	9 %	+	1,34	BR	9,4
K340	20	20	12	7 %	+	1,49	Señal baja	12,9
Q386	9	19	13	8 %	+	1,49	NBR	16,9
K392	11	34	2	1 %	+	1	NBR	18
S383	39	13	23	13 %	+	0,72	BR	21,3
M358	25	16	16	10 %	+	0,93		21,6
E356	44	10	25	14 %	+	0,66	BR	27
K360	55	12	23	14 %	+	0,42	BR	31,2
Y436	22	35	ND	ND	+	0,6	Señal baja	32,6
N384	127	1	69	40 %	+	0,25	BR	34,9
Q342	6,5	30	4,5	3 %	+	1,59	Señal baja	35,1

Ejemplo 3

- 5 Fidelidad de la incorporación de un aminoácido no natural en un conjugado de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo

Este Ejemplo describe una evaluación de la fidelidad de la incorporación de un aminoácido no natural en un conjugado de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo. Trastuzumab sustituido con p-azido-fenilalanina sustituida en S136 conjugado con DBCO-MMAF, se digirió con tripsina y se analizó en un sistema de LC-MS Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF equipado con una fuente de nanoelectronebulización ChipCube. Se buscaron péptidos que contenían posibles aminoácidos incorporados de forma errónea y sus contrapartes de tipo silvestre utilizando cromatogramas iónicos extraídos de los datos de LC-MS dentro de ± 10 ppm de la m/z teórica para los estados de carga $z = 1-4$ del péptido. Si la m/z del pico encontrado estaba dentro de ± 10 ppm de la m/z teórica y el estado de carga correcto, se consideraron posibles coincidencias hasta la verificación por MS/MS. En ausencia de señal de incorporación errónea, se asumió que la señal era igual o menor que el ruido en el espectro de masas. La tasa de fidelidad mínima se calculó como una relación de ruido con respecto a la señal. La señal se midió como el promedio de todos los iones monoisotópicos a través del perfil de elución del péptido para el estado de carga más abundante y el ruido se estimó en el mismo espectro en una región adyacente a la que muestra una cantidad de señal mínima.

10

15

20 Cuando un péptido observado contenía un suceso de incorporación errónea, se usó su señal promediada en lugar de la medición del ruido.

En el mapa peptídico del conjugado anticuerpo-fármaco analizado, se detectó un péptido con AAnn + fármaco conjugado en los estados de carga 2 y 3 con un error de menos de 4 ppm. En la posición 136, no hubo incorporación de tirosina y se determinó que la eficacia de incorporación para pAzPhe era del 98,3 %. No se detectó incorporación errónea de tirosina en las posiciones de Phe a través de la secuencia de IgG detectada. La eficacia global de incorporación de Phe se midió como de un mínimo del 99,7 %.

25

Ejemplo 4

Evaluación de la estabilidad térmica de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo

- 5 Este ejemplo describe experimentos diseñados para medir la estabilidad térmica (T_m) de las variantes de trastuzumab y trastuzumab no glucosilados. El ensayo de cambio térmico se llevó a cabo mezclando la proteína a ensayar (Sutroceptin y variantes) con un tinte sensible al entorno (SYPRO Orange, Life Technologies n.º de Cat S-6650) en una solución tamponada (PBS), y controlando la fluorescencia de la mezcla en tiempo real, a medida que experimentaba desnaturalización térmica controlada. La concentración final de la proteína en la mezcla de ensayo
- 10 estuvo entre 100-250 $\mu\text{g/ml}$ y el colorante se diluyó 1:1000 a partir de la solución madre original (el colorante de la solución madre esta 5000x en DMSO). Después de dosificar alícuotas de 5 μl de la mezcla de proteína-colorante en una microplaca de 384 pocillos (Bio-Rad n.º de Cat. MSP-3852), la placa se selló con una película de sellado ópticamente transparente (Bio-Rad n.º de Cat. MSB-1001), y se colocó en un termociclador en tiempo real de placas de 384 pocillos (Bio-Rad CFX384 Real Time System). La mezcla de proteína-colorante se calentó de 25 °C a 95 °C,
- 15 en aumentos de 0,1 °C por ciclo (~1,5 °C por minuto), permitiendo 3 segundos de equilibrio a cada temperatura antes de tomar una medición de fluorescencia. Al final del experimento, se determinó la temperatura de fusión (T_m) utilizando el programa informático Bio-Rad CFX manager. Para muestras de proteínas con perfiles complejos de transición térmica, la temperatura de fusión (T_m) se calcula a partir de la representación de la derivada negativa de primer orden de la intensidad de fluorescencia (eje Y) frente a la temperatura (eje X), o ajustando los datos al modelo sigmoide de Boltzmann. La diferencia en la temperatura de fusión de las variantes de IgG con respecto a la proteína de tipo silvestre es una medida del cambio térmico para la proteína que se está sometiendo a ensayo.
- 20

- Los resultados de este ensayo para determinadas variantes se muestran en la **Tabla 4**. En general, las desviaciones en la T_m significativamente por debajo de trastuzumab no sustituido, particularmente en la T_{m1} , indican una pérdida
- 25 no deseada de estabilidad y/o una propensión a agregarse. Por tanto, son preferentes las variantes de trastuzumab que presentan una T_{m1} y/o T_{m2} dentro de aproximadamente 5 °C de trastuzumab no sustituido. Son más preferentes las variantes que presentan una T_{m1} y/o T_{m2} dentro de aproximadamente 3 °C de trastuzumab no sustituido. Son aún más preferentes las variantes que presentan una T_{m1} y/o T_{m2} dentro de aproximadamente 2 °C de trastuzumab no sustituido. Son aún más preferentes las variantes que presentan una T_{m1} y/o T_{m2} dentro de aproximadamente
- 30 1 °C de trastuzumab no sustituido. Las T_{m1} y T_{m2} se pueden medir en las formas conjugadas o no conjugadas.

Tabla 4

Anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco	Variante de Trastuzumab	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
Anticuerpo	Trastuzumab no glucosilado	63,5 +/- 0,6	76,5 +/- 0,1
Anticuerpo	T359	64,0 +/- 0,4	76,8 +/- 0,0
Anticuerpo	E293	59,7 +/- 0,7	76,1 +/- 0,1
Anticuerpo	K334	49,5 +/- 0,8	76,5 +/- 0,1
Anticuerpo	R355	63,6 +/- 0,4	76,8 +/- 0,1
Anticuerpo	N389	62,8 +/- 0,1	76,8 +/- 0,0
Conjugado de anticuerpo-fármaco	T359	63,9 +/- 0,6	76,7 +/- 0,1
Conjugado de anticuerpo-fármaco	E293	59,2 +/- 0,0	76,0 +/- 0,3
Conjugado de anticuerpo-fármaco	K334	59,0 +/- 0,2	76,3 +/- 0,2
Conjugado de anticuerpo-fármaco	R355	63,7 +/- 0,4	76,6 +/- 0,1
Conjugado de anticuerpo-fármaco	N389	61,9 +/- 0,5	76,4 +/- 0,0

Ejemplo 5

35

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: sustitución de la cadena ligera

Los métodos descritos en el Ejemplo 9 se utilizaron para crear y analizar variantes con sustituciones en las cadenas ligeras. Los resultados de estos experimentos de caracterización se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Variantes de LC seleccionadas

Variante	Cadena	ADC purificado final ($\mu\text{g/ml}$)	RFA	Perfil de CIH	CI_{50} de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
A43	LC	67,60	1,44	BR	3,73
Y49	LC	123,46	1,86	BR	2,00
S56	LC	97,40	1,78	BR	2,58
G57	LC	89,78	1,66	NBR	3,43
S60	LC	146,77	1,56	NBR	2,63

(continuación)

Variante	Cadena	ADC purificado final (ug/ml)	RFA	Perfil de CIH	Cl ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
S67	LC	121,38	1,53	NBR	3,73
G68	LC	55,30	1,35	NBR	2,37
T109	LC	95,58	1,62	BR	2,25
A112	LC	80,50	1,10	BR	1,87
S114	LC	92,86	0,96	BR	2,21
A144	LC	61,74	1,39	BR	2,56
A153	LC	104,07	1,53	BR	3,59
S156	LC	77,65	1,36	BR	1,98
G157	LC	65,25	0,98	BR	3,45
S168	LC	86,99	1,10	BR	4,01
A184	LC	66,15	1,20	BR	4,24
S202	LC	88,17	1,71	NBR	2,56
S203	LC	92,60	1,75	BR	2,46
T206	LC	95,40	0,77	BR	4,93

5 Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera (LC): A043, Y049, S056, G057, S060, S067, G068, T109, A112, S114, A144, A153, S156, G157, S168, A184, S202, S203 e T206.

10 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,0. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: A043, Y049, S056, G057, S060, S067, G068, T109, A112, A144, A153, S156, S168, A184, S202 e S203.

15 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,2. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: A043, Y049, S056, G057, S060, S067, G068, T109, A144, A153, S156, A184, S202 e S203.

20 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,5. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: Y049, S056, G057, S060, S067, T109, A153, S202 e S203.

20 Ejemplo 6

Evaluación de la expresión de HC-F404 en un extracto atenuado para RF-1

25 Para evaluar inicialmente los efectos del uso de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 en la incorporación de un aminoácido no natural, se expresaron 12 variantes que se expresaron mal en la cepa positiva para RF-1 y se cambiaron de escala en la cepa atenuada para RF-1. Una de tales variantes, HC-F404, presentó propiedades excepcionalmente convenientes, como se analiza a continuación.

30 El extracto sin células utilizado para esta reacción de síntesis de proteínas sin células se preparó a partir de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT que también se diseñó técnicamente para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de terminación ámbar. Después de la adición del molde de ADN que codifica HC-F404 y la LC de TS, la reacción sin células se incubó a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm a una escala de 1 ml x 6 (para un total de 9 ml) en una placa en flor (m2p-labs n.º MTP-48-B). Después, la proteína se purificó en Proteína A y resina Cpto Adhere utilizando un marcador de proteínas (Emerald Bio).

35 La conjugación con el fármaco (DBCO-MMAF) y la preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC) para el análisis adicional se realizó como se describe anteriormente.

40 El análisis de Thermofluor de las variantes se llevó a cabo como se describe anteriormente

45 La variante de HC F404 generada tanto durante la inspección de TAG así como en la escala intermedia mostró una buena capacidad de destrucción de células (inspección de TAG I: Cl₅₀ = 0,018 nM; Aumento de escala intermedio: Cl₅₀ = 0,023 nM), pero la estimación de la RFA basándose en su perfil de CIH resultó problemática, debido a la baja resolución de los picos, posiblemente debido a la inaccesibilidad del fármaco a la columna analítica durante el análisis por CIH. Sin embargo, el análisis por MS mostró que tenía una RFA de 1,74. Además, el análisis de

thermofluor mostró que la versión de ADC de HC-F404 tenía una T_{m1} mejorada (mayor estabilidad térmica) (aumento de 2,2 °C) en comparación con solo el anticuerpo.

Tabla 6A: Propiedades de la variante HC-F404

Cadena	Variante	Concentración final del ADC purificado	RFA	Perfil de MS	Cl ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
HC	F404	541	1,74	BR*	3,5

* - Este resultado de la RFA está basado en el análisis por LC-MS. La variante conjugada produjo un pico no bien resuelto (NBR) en el ensayo de CIH, y la RFA se determinó utilizando LC-MS

Tabla 6B: Resultados de thermofluor para la variante HC-F404

		Solo anticuerpo		Conjugado de anticuerpo-fármaco	
Cadena	Variante de Trastuzumab	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
HC	F404	61,2+/- 0,2	76,6 +/- 0,1	63,5 +/- 0,4	76,5+/- 0,1

Ejemplo 7

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis del factor de liberación

5 Métodos de inspección de TAG I y listado de variantes seleccionadas

Los extractos sin células utilizados para las reacciones de síntesis de proteínas sin células se prepararon a partir de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT que también se diseñó técnicamente para expresar un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural en un cadón de terminación ámbar. Después de la adición del molde de ADN, las reacciones sin células se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm en placas en flor (m2p-labs n.º MTP-48-B). Para la síntesis de variantes de la cadena ligera (variantes que tenían incorporación de AAnn en la cadena ligera), se utilizó una relación de ADN de 4 ug/ml de ADN de cadena ligera a 8 ug/ml de ADN de cadena pesada. Cada variante de trastuzumab se produjo en una escala de 1 ml en placas de 48 pocillos con forma de flor sin duplicados. Se utilizaron un total de 6 placas para expresar las variantes.

El sobrenadante se capturó con IMAC Phytip que contenía 40 µl de resina pipeteando arriba y abajo lentamente 10 veces a un caudal de 4,2 ul/min. La proteína unida se eluyó con 125 µl de tampón de elución IMAC (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM). Después de la purificación, las variantes purificadas por IMAC se cuantificaron en un sistema Caliper GXII comparando con los patrones de masa de HERCEPTIN® procesados en el mismo Protein Express LabChip (Caliper LifeSciences n.º 760499). Las muestras se prepararon para el análisis como se especifica en el kit Protein Express Reagent (Caliper Life Sciences n.º 760328) con la excepción de que las muestras (mezcladas en tampón de muestra) se calentaron a 65 °C durante 10 minutos antes del análisis en el sistema Caliper.

La conjugación con el fármaco (DBCO-MMAF) y la preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC) para el análisis adicional se realizó como se describe anteriormente.

Los resultados positivos de estos experimentos de caracterización se presentan en la **Tabla 7**. En la Tabla, se muestran las siguientes propiedades de las variantes: concentración final del conjugado anticuerpo-fármaco preparado, la capacidad de unirse a las células que expresan HER2, la relación fármaco-anticuerpo (RFA, expresada como el número de agentes citotóxicos por anticuerpo), un comentario con respecto al perfil de CIH y la Cl₅₀ observada en el ensayo de destrucción de células descrito previamente. En los comentarios con respecto al ensayo de CIH, PU corresponde a un perfil que se resolvió bien como un único pico, NBR corresponde a un perfil mal resuelto y BR corresponde a un perfil de CIH bien resuelto. Varias de las variantes que presentaron un perfil de pico único también presentaron una potente destrucción, lo que indica que la variante sí se conjugó con el fármaco, pero no se resolvió en la columna de CIH.

Tabla 7: Variantes seleccionadas para inspección de Tag I

Variante	Cadena	ADC purificado final (ug/ml)	RFA	Perfil de CIH	Cl ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
A023	HC	74	1,6	BR	7,1
A084	HC	93	1,5	BR	8,7
A118	HC	96	1,6	BR	7,3
S119	HC	89	1,5	NBR	8,3
T135	HC	64	1,6	BR	4,4

ES 2 718 478 T3

(continuación)

Variantes	Cadena	ADC purificado final (ug/ml)	RFA	Perfil de CIH	CI ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
S136	HC	71	1,6	BR	6,6
G137	HC	53	1,4	NBR	7,4
S160	HC	42	1,6	NBR	6,6
G161	HC	25	1,2	NBR	8,9
A162	HC	45	1,5	BR	7,9
T164	HC	36	1,1	NBR	9,0
T195	HC	40	1,6	BR	6,6
T197	HC	29	1,2	NBR	8,7
S219	HC	66	1,7	BR	6,6
V282	HC	52	1,0	NBR	1,6
T289	HC	46	0,3	BR	2,1
Y296	HC	32	1,5	BR	7,2
A330	HC	80	ND	PU	2,4
T335	HC	43	0,7	NBR	2,3
N361	HC	42	1,0	BR	5,9
S400	HC	51	0,5	BR	7,1
F404	HC	20	ND	NBR	4,3
V422	HC	100	1,3	BR	4,0
S440	HC	74	1,2	BR	6,1
T260	HC	37	0,1	NBR	4,4
S267	HC	94	1,7	BR	7,2
H268	HC	45	0,4	NBR	7,5
E272	HC	50	1,2	BR	3,0
K274	HC	64	0,8	BR	2,8
R292	HC	101	ND	PU	9,0
E293	HC	133	1,7	BR	9,0
N297	HC	45	1,7	BR	4,7
S298	HC	60	1,5	BR	5,4
V303	HC	75	1,5	BR	12,7
V305	HC	66	1,5	BR	7,0
1332	HC	47	ND	NBR	2,6
E333	HC	47	ND	NBR	2,6
K334	HC	83	1,8	BR	6,9
K340	HC	76	1,5	BR	4,4
G341	HC	29	1,5	BR	3,8
Q342	HC	60	1,3	BR	4,8
P343	HC	51	0,8	BR	6,6
R355	HC	54	1,4	BR	4,6
Q362	HC	89	1,1	BR	6,3
Q386	HC	124	ND	NBR	4,0
K392	HC	40	1,6	BR	3,4
S424	HC	24	1,3	BR	4,9
Q438	HC	33	1,5	BR	5,2
S442	HC	57	1,4	BR	4,3
L443	HC	39	1,4	BR	3,0

Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada (HC): A023, A084, A118, S119, T135, S136, G137, S160, G161, A162, T164, T195, T197, S219,

V282, T289, Y296, A330, T335, N361, S400, F404, V422, S440, T260, S267, H268, E272, K274, R292, E293, N297, S298, V303, V305, 1332, E333, K334, K340, G341, Q342, P343, R355, Q362, Q386, K392, F404, S424, Q438, S442 y L443.

5 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 0,7. Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada (HC): A023, A084, A118, S119, T135, S136, G137, S160, G161, A162, T164, T195, T197, S219, V282, Y296, T335, N361, V422, S440, S267, E272, K274, E293, N297, S298, V303, V305, K334, K340, G341, Q342, P343, R355, Q362, K392, F404, S424, Q438, S442 y L443.

10 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,0. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: A023, A084, A118, S119, T135, S136, G137, S160, G161, A162, T164, T195, T197, S219, V282, Y296, N361, V422, S440, S267, E272, E293, N297, S298, V303, V305, K334, K340, G341, Q342, R355, Q362, K392, F404, S424, Q438, S442 y L443.

15 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,2. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: A023, A084, A118, S119, T135, S136, G137, S160, G161, A162, T195, T197, S219, V282, Y296, V422, S440, S267, E272, E293, N297, S298, V303, V305, K334, K340, G341, Q342, R355, K392, F404, S424, Q438, S442 y L443.

20 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,5. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: A023, A084, A118, S119, T135, S136, S160, A162, T195, S219, V282, Y296, S267, E293, N297, S298, V303, V305, K334, K340, G341, K392, F404 e Q438.

Ejemplo 8

30 Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis del factor de liberación adicional

Métodos de inspección de TAG II y listado de variantes seleccionadas

35 Los extractos sin células utilizados para las reacciones de síntesis de proteínas sin células se prepararon a partir de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT que también se diseñó técnicamente para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural (p-azido-fenilalanina) en un codón de terminación ámbar. Después de la adición del molde de ADN, las reacciones sin células se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 650 rpm en placas en flor (m2p-labs n.º MTP-48-B). Para la síntesis de variantes de la cadena ligera (variantes que tenían incorporación de AAnn en la cadena ligera), se utilizó una relación de ADN de 40 4 µg/ml de ADN de cadena ligera a 8 µg/ml de ADN de cadena pesada. Cada variante de trastuzumab se produjo en una escala de 1 ml en placas de 48 pocillos con forma de flor sin duplicados. Se utilizaron un total de 6 placas para expresar las variantes.

45 El sobrenadante se capturó con IMAC Phytip que contenía 40 µl de resina pipeteando arriba y abajo lentamente 10 veces a un caudal de 4,2 µl/min. La proteína unida se eluyó con 125 µl de tampón de elución IMAC (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM). Después de la purificación, las variantes purificadas por IMAC se cuantificaron en un sistema Caliper GXII comparando con los patrones de masa de HERCEPTIN® procesados en el mismo Protein Express LabChip (Caliper LifeSciences n.º 760499). Las muestras se prepararon para el análisis como se especifica en el kit Protein Express Reagent (Caliper Life Sciences n.º 760328) con la excepción de que las 50 muestras (mezcladas en tampón de muestra) se calentaron a 65 °C durante 10 minutos antes del análisis en el sistema Caliper.

La conjugación con el fármaco (DBCO-MMAF) y la preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC) para el análisis adicional se realizó como se describe anteriormente.

55 Los resultados positivos de estos experimentos de caracterización se presentan en la **Tabla 8**. En la Tabla, se muestran las siguientes propiedades de las variantes: la concentración final del conjugado anticuerpo-fármaco preparado, la eficacia de la expresión del producto de longitud completa en comparación con el tipo silvestre (eficacia de supresión), la capacidad de unirse a las células que expresan HER2, la relación fármaco-anticuerpo (RFA, expresada como el número de agentes citotóxicos por anticuerpo), un comentario con respecto al perfil de CIH y la CI₅₀ observada en el ensayo de destrucción de células descrito previamente. En los comentarios con respecto al 60 ensayo de CIH, PU corresponde a un perfil que se resolvió bien como un único pico, NBR corresponde a un perfil mal resuelto y BR corresponde a un perfil de CIH bien resuelto. Varias de las variantes que presentaron un perfil de pico único también presentaron una potente destrucción, lo que indica que la variante sí se conjugó con el fármaco, 65 pero no se resolvió en la columna de CIH.

5 En total, se exploraron en cuanto a las actividades descritas variantes de trastuzumab que tenían un aminoácido no natural en 269 sitios. La **Tabla 8** presenta las 71 variantes que tenían una RFA conveniente, los perfiles de expresión, las eficacias de supresión y/o los valores de Cl_{50} . Ninguna de estas propiedades pudo predecirse antes del análisis, y muchas veces los valores para cada propiedad individual variaron de forma impredecible dentro de una muestra. Por ejemplo, uno esperaría generalmente que las variantes con una alta RFA mostraran valores de Cl_{50} más bajos que aquellos con una baja RFA. No obstante, la variante 151, por ejemplo, presentó una RFA relativamente baja de 0,6 pero presentó una Cl_{50} de 1 ng/ml.

Tabla 8. Variantes de la inspección de Tag II

Variantes	Cadena	MMAF (Pos CM) (ug/ml)	RFA	Perfil de CIH	SKBR3, Cl_{50} , ng/ml	Supresión, % de ts mediante ^{14}C
G42	HC	64	1,4	BR	7,9	51
Q3	HC	113	1,4	BR	5,3	73
S7	HC	74	1,6	BR	4,6	50
P14	HC	100	1,5	BR	9,6	63
G16	HC	62	1,4	NBR	8,5	50
R19	HC	130	1,6	BR	9	107
S25	HC	197	1,5	BR	4,1	154
A40	HC	124	1,7	BR	5,7	72
K43	HC	84	1,5	BR	7,3	68
151	HC	30	0,6	NBR	1	NR
Y52	HC	149	1,7	BR	8,9	74
T53	HC	242	1,1	BR	8,0	122
Y56	HC	287	1,1	BR	16,0	95
S70	HC	59	1,5	BR	6	38
N82A	HC	83	1,4	BR	5,4	48
D98	HC	46	0,6	NBR	5	48
F100	HC	51	1,5	BR	48,2	33
T110	HC	80	1,7	BR	4	89
S112	HC	89	1,7	BR	4,7	90
K121	HC	60	1,6	BR	4,4	57
Y180	HC	72	1,6	BR	5,6	44
S184	HC	42	ND	PU	9,9	56
S190	HC	95	1,4	BR	7,1	63
S192	HC	70	1,5	BR	5,6	66
K214	HC	156	1,6	BR	5,8	41
E216	HC	146	1,6	BR	4,9	72
D221	HC	178	1,4	BR	9,6	75
K222	HC	194	1,5	BR	8,4	87
T225	HC	156	1,4	BR	8,3	81
P227	HC	96	1,5	NBR	6,2	68
P230	HC	157	1,5	NBR	6,0	122
A231	HC	147	1,6	NBR	5,5	97
P232	HC	107	1,5	NBR	5,5	86
G236	HC	74	1,6	BR	4,5	70
menos 1	LC	245	1,5	BR	8,8	66
Q3	LC	266	1,1	BR	9,1	66
T5	LC	252	1,2	BR	7,3	72
S7	LC	275	1,3	BR	6	77
P8	LC	256	1,3	BR	6,1	71
S9	LC	290	1,1	BR	6,8	NR
S10	LC	285	0,6	BR	7,9	76
G16	LC	216	1,5	NBR	6,4	68
D17	LC	159	1,2	BR	8,3	59

(continuación)

Variantes	Cadena	MMAF (Pos CM) (ug/ml)	RFA	Perfil de CIH	SKBR3, Cl ₅₀ , ng/ml	Supresión, % de ts mediante ¹⁴ C
R18	LC	230	1,3	BR	7,5	67
T20	LC	230	1,2	BR	4,9	83
T22	LC	229	1,4	BR	6,7	167
S26	LC	209	1,1	BR	7,8	61
Q27	LC	194	1,2	BR	8,0	70
K45	LC	184	1,2	BR	4,6	66
V58	LC	170	1,3	NBR	8,2	71
S63	LC	219	1,5	NBR	6	85
S65	LC	223	1,1	BR	8,7	83
R66	LC	234	1,1	BR	9,0	93
D70	LC	201	1,0	BR	3	73
S77	LC	193	1,4	BR	5,2	67
Q79	LC	207	1,3	BR	9,4	60
K107	LC	223	1,2	BR	9,1	78
N138	LC	132	0,6	BR	6	57
R142	LC	140	1,2	BR	7,1	51
E143	LC	192	0,9	BR	3	71
N152	LC	185	1,2	BR	6,5	87
S171	LC	250	1,1	BR	5,1	122
S182	LC	217	1,3	BR	8,1	103
K188	LC	150	1,4	BR	4,6	134
Q199	LC	185	1,5	BR	7,1	71
L201	LC	198	0,8	BR	5	127

5 Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada (HC): G042, Q003, S007, P014, G016, R019, S025, A040, K043, I051, Y052, T053, Y056, S070, N082A, D098, F100, T110, S112, K121, Y180, S184, S190, S192, K214, E216, D221, K222, T225, P227, P230, A231, P232 e G236.

10 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 0,7. Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada (HC): G042, Q003, S007, P014, G016, R019, S025, A040, K043, Y052, T053, Y056, S070, N082A, F100, T110, S112, K121, Y180, S190, S192, K214, E216, D221, K222, T225, P227, P230, A231, P232 e G236.

15 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,0. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: G042, Q003, S007, P014, G016, R019, S025, A040, K043, Y052, T053, Y056, S070, N082A, F100, T110, S112, K121, Y180, S190, S192, K214, E216, D221, K222, T225, P227, P230, A231, P232 e G236.

20 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,2. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: G042, Q003, S007, P014, G016, R019, S025, A040, K043, Y052, S070, N082A, F100, T110, S112, K121, Y180, S190, S192, K214, E216, D221, K222, T225, P227, P230, A231, P232 e G236.

25 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,5. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: S007, P014, R019, S025, A040, K043, Y052, S070, F100, T110, S112, K121, Y180, K214, E216, K222, P227, P230, A231, P232 e G236.

30 Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera (LC): menos 1, Q003, T005, S007, P008, S009, S010, G016, D017, R018, T020, T022, S026, Q027, K045, V058, S063, S065, R066, D070, S077, Q079, K107, N138, R142, E143, N152, S171, S182, K188, Q199 e L201.

Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 0,7. Las variantes preferentes incluyen aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera:

menos 1, Q003, T005, S007, P008, S009, G016, D017, R018, T020, T022, S026, Q027, K045, V058, S063, S065, R066, D070, S077, Q079, K107, R142, E143, N152, S171, S182, K188, Q199 e L201.

5 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,0. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: menos 1, Q003, T005, S007, P008, S009, G016, D017, R018, T020, T022, S026, Q027, K045, V058, S063, S065, R066, D070, S077, Q079, K107, R142, N152, S171, S182, K188 e Q199.

10 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,2. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: menos 1, T005, S007, P008, G016, D017, R018, T020, T022, Q027, K045, V058, S063, S077, Q079, K107, R142, N152, S182, K188 e Q199.

15 Además, son preferentes las variantes que tienen un RFA de al menos aproximadamente 1,5. Aún más preferentes fueron las variantes que incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: menos 1, G016, S063 e Q199.

Ejemplo 9

20 Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis del aumento de escala

Aumento de escala de las variantes seleccionadas a partir de la inspección de TAG II

25 Basándose en los datos de la RFA y de destrucción de células, se seleccionó un subconjunto de variantes de trastuzumab con características convenientes para la expresión sin células a pequeña escala, para generar material para una caracterización adicional. Las variantes de la cadena pesada seleccionadas para la producción a pequeña escala fueron: R019, S025, I051, S070, D098, T110, S112, K121, S136, Y180, S187, S190, K214, E216, D221 e K222. Las variantes de la cadena ligera seleccionadas para la producción a pequeña escala fueron: (-)1, S007, P008, G016, T022, S063, R014, D070, N138, R142, E143 y N152.

30 La mezcla de reacción sin células en la que se sintetizaron las variantes comprendía una mezcla 80 %:20 % de extractos sin células preparados a partir de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT, y se diseñó técnicamente una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT para expresar un ARNt codificante de CUA ortogonal, respectivamente. Todas las variantes se aumentaron de escala hasta 9 ml en placas en flor (1,5 ml x 6 repeticiones) y se purificaron utilizando marcador de proteínas (Emerald Bio).

35 La conjugación con el fármaco (DBCO-MMAF) y la preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC) para el análisis adicional se realizó como se describe anteriormente.

40 Los resultados positivos de estos experimentos de caracterización se presentan en la **Tabla 9**. En la Tabla, se muestran las siguientes propiedades de las variantes: la concentración final del conjugado anticuerpo-fármaco preparado, la eficacia de la expresión del producto de longitud completa en comparación con el tipo silvestre (eficacia de supresión), la capacidad de unirse a las células que expresan HER2, la relación fármaco-anticuerpo (RFA, expresada como el número de agentes citotóxicos por anticuerpo), un comentario con respecto al perfil de CIH y la CI₅₀ observada en el ensayo de destrucción de células descrito previamente. En los comentarios con respecto al
45 ensayo de CIH, PU corresponde a un perfil que se resolvió bien como un único pico, NBR corresponde a un perfil mal resuelto y BR corresponde a un perfil de CIH bien resuelto.

Tabla 9: Un subconjunto de variantes preferentes

Cadena	Variante	Concentración final del ADC purificado	RFA	Perfil de CIH	CI ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
HC	R19	146	1,67	BR	5,4
HC	S25	218	1,55	BR	4,9
HC	S70	134	1,67	BR	4,6
HC	T77	192	1,05	BR	7,5
HC	T110	196	1,46	BR	4,3
HC	S112	212	1,6	BR	1,8
HC	Y180	264	1,29	BR	4,9
HC	Y79	412	0,46	BR	8,1
HC	K121	319	1,61	BR	2,8
HC	S190	135	1,23	BR	5,0
HC	K214	202	1,47	BR	2,5

(continuación)

Cadena	Variante	Concentración final del ADC purificado	RFA	Perfil de CIH	Cl ₅₀ de destrucción de células SKBR3 (ng/ml)
HC	E216	234	1,3	BR	2,8
HC	D221	284	1,16	BR	3,5
HC	K222	308	1,21	BR	3,0
LC	menos 1	804	1,52	BR	4,8
LC	S7	378	1,50	BR	2,7
LC	P8	784	1,46	BR	4,1
LC	G16	363	1,64	BR	3,0
LC	T22	392	1,50	BR	4,3
LC	S63	441	1,58	BR	3,6
LC	R142	377	1,61	BR	2,5
LC	N152	388	1,42	BR	3,1

Ejemplo 10

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis de Thermofluor

El análisis de Thermofluor de las variantes se llevó a cabo como se describe anteriormente. Los resultados de Thermofluor están en la **Tabla 10**.

5

Tabla 10: Datos de thermofluor para variantes de producción a pequeña escala

Cadena	Variante de Trastuzumab	Solo anticuerpo		Conjugado de anticuerpo-fármaco	
		T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
	Trastuzumab no glucosilado	61,4+/- 0,6	76,2+/- 0,1	N/E	N/E
LC	menos 1	61,7+/- 0,4	75,6+/- 0,1	61,3+/- 0	74,4+/- 0,1
LC	S7	62+/- 0,1	76,9 +/- 0	60,7+/- 0,1	76,2 +/- 0
LC	P8	61,8+/- 0,1	71 +/- 0	61,2+/- 0,7	70,3 +/- 0
LC	G16	61,9+/- 0,1	74,1 +/- 0,1	61,1 +/- 0,5	73,4+/- 0,1
LC	T22	61,7+/- 0	76,8 +/- 0	61,6+/- 0,2	76,4+/- 0,1
LC	S63	61,7+/- 0,1	75,5 +/- 0	61,4+/- 0	74,3 +/- 0
LC	D70	61,9+/- 0,1	76,6+/- 0,1	61,8+/- 0	76+/- 0,1
LC	N138	61,9+/- 0,1	75,6 +/- 0,2	61,6+/- 0,4	74,4 +/- 0
LC	R142	61,8+/- 0,1	73,9+/- 0,1	61,7+/- 0,1	72,3 +/- 0,2
LC	E143	62+/- 0,1	76,2 +/- 0	61,4+/- 0,1	75 +/- 0
LC	N152	59,3 +/- 0	76,3 +/- 0	59,3 +/- 0	76,5 +/- 0
LC	L201	62+/- 0,1	75,6+/- 0,1	61,2+/- 0,1	74,4 +/- 0
HC	R19	61,5+/- 0,4	77,1 +/- 0,3	61,6+/- 0,4	73,7 +/- 0
HC	S25	61,4+/- 0	75 +/- 0	61,6+/- 0,3	72,4 +/- 0
HC	151	61,6+/- 0,6	72,7+/- 0,1	61 +/- 0	71,8+/- 0,2
HC	S70	61,6+/- 0,2	77,8 +/- 0,1	61,5+/- 0,6	76,2 +/- 0
HC	T77	61,8+/- 0,5	75+/- 0,1	61,5+/- 0,1	73,3 +/- 0
HC	Y79	61,6+/- 0,2	76,1 +/- 0,1	61,7+/- 0,1	76+/- 0,1
HC	D98	62,1 +/- 0,1	75,3 +/- 0,2	61,5+/- 0,3	74,4+/- 0,1
HC	T110	61,6+/- 0,2	73,6 +/- 0	61,4+/- 0	71,5+/- 0,1
HC	S112	61,5+/- 0,1	72,6+/- 0,1	61,8+/- 0,3	73,9 +/- 0
HC	K121	61,4+/- 0,1	75,1 +/- 0	61,4+/- 0,1	74,7+/- 0,1
HC	S136	61,4+/- 0,1	76,7 +/- 0,2	61,1 +/- 0,2	76,3 +/- 0
HC	Y180	61,4+/- 0,1	76,2 +/- 0	61,6+/- 0,3	75,4 +/- 0,6
HC	S187	62,2+/- 0,1	68,5 +/- 0,3	61,7+/- 0,4	68,3 +/- 0
HC	S190	61,5+/- 0,2	77,2+/- 0,1	59,2 +/- 0	77+/- 0,1

(continuación)

Cadena	Variante de Trastuzumab	Solo anticuerpo		Conjugado de anticuerpo-fármaco	
		T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
	Trastuzumab no glucosilado	61,4+/- 0,6	76,2+/- 0,1	N/E	N/E
HC	K214	59,1 +/- 0,1	76,9+/- 0,1	59,1 +/- 0	76,3+/- 0,1
HC	E216	59,1 +/- 0	76,5 +/- 0	59,1 +/- 0,1	76,2+/- 0,1
HC	D221	59,1 +/- 0	76,7+/- 0,1	59+/- 0,1	76,7+/- 0,1
HC	K222	59,1 +/- 0,1	76,7+/- 0,1	59+/- 0,1	76,5+/- 0,1

Las variantes sometidas al análisis de Thermofluor incluían aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena pesada: R019, S025, I051, S070, T077, Y079, D098, T110, S112, K121, S136, Y180, S187, S190, K214, E216, D221 e K222.

Las variantes sometidas al análisis de Thermofluor incluían también aquellas con un aminoácido no natural reemplazando estas posiciones de la cadena ligera: menos 1, S007, P008, G016, T022, S063, D070, N138, R142, E143, N152 e L201.

Ejemplo 11

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis de cinética

Cinética de conjugación de las variantes seleccionadas

Se determinaron las tasas de conjugación para cinco variantes que mostraron un amplio intervalo de relación de conjugado de fármaco con respecto a anticuerpo. Las reacciones se iniciaron mediante la mezcla de variantes con el fármaco (DBCO-MMAF) en PBS (pH 7,4) a 20 °C en duplicados durante 15 min, 30 min, 1 hora, 2 hora, 4 horas, 8 horas y 16 horas. Las concentraciones finales de anticuerpos en la mezcla varían de 0,2 a 2 µM. La concentración final del fármaco para todas las reacciones es de 100 µM. Al final del período de incubación, se añadió NaAzida a la mezcla a una concentración final de 10 mM. La mezcla final se purificó mediante placas Zeba y MustangQ, como se describe anteriormente. La concentración de IgG se determinó por Caliper utilizando Herceptin como patrón de la masa. La fracción de variantes totalmente conjugadas se determinó por COH, como se describe anteriormente.

Tabla 11. Semividas y RFA de las variantes

	HC-S112	HC-T110	HC-T77	HC-Y79	HC-F126
T _½	6,2 h	10,5 h	~40 h	~270 h	ND
RFA	1,7	1,6	1,1	0,4	0

Las Figuras 5A y 5B proporcionan los trazados de CIH de dos variantes (HC T110 y HC S112). Los trazados mostraron tres picos (P0, P1 y P2) correspondientes a picos con IgG no conjugada, IgG conjugada de forma única y IgG completamente conjugada, respectivamente.

Las figuras 6A a 6E muestran que la conjugación de las variantes de para-azido fenilalanina (pAzF) es de localización específica. Los porcentajes del total de anticuerpos conjugados de forma única y totalmente se separaron mediante CIH.

Ejemplo 12

Caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo: Análisis de comparación de supresión

Comparación de la supresión por para-azido fenilalanina (pAzF) y par-azido metil fenilalanina (pAzMeF)

Se expresaron once variantes con una serie de eficacias de supresión en una reacción de síntesis de proteínas sin células, como se describe a continuación en Zawada *et al.*, 2011, *Biotechnol. Bioeng.*108(7): 1570-1578 con las modificaciones descritas a continuación. Además, se preparó trastuzumab no sustituido como control. Se trataron extractos sin células que contenían ARNt y RF1 sensible a OmpT (mezcla 80/20 de las cepas 16/23) con yodoacetamida 50 µM durante 30 minutos a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contenía todos los demás componentes excepto GSSG, aminoácidos no naturales, ARNt sintetas, ARNP de T7, DsbC, PDI y ADN molde. Se añadieron a la mezcla todos los reactivos restantes, excepto el ADN. Las reacciones sin células se iniciaron mediante la adición de ADN plasmídico de las variantes seleccionadas y se incubaron a 30 °C durante 12 h en un agitador a 450 rpm en placas de 96 pocillos. La reacción se incubó adicionalmente a 4 °C durante 5 h. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas fue de 30 % de extracto celular, para-azido fenilalanina (pAzF) (RSP Amino Acids) 1 mM con aminoacil ARNt sintasa específica de pAzMeF de *M jannaschii* (FRS) 0,37 mg/m o para-azido metil fenilalanina (pAzMeF) 1 mM con aminoacil-ARNt sintetasa específica de p-

- cianofenilalanina 0,37 mg/ml (Young *et al.*, 2011, *Biochem.* 50: 1894-1900), GSSG 2 mM, PDI 0,29 mg/ml (Mclab), DsbC de *E. coli* 100 µg/ml, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1,2 mM, 0,86 mM de cada GMP, UMP y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0,5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermina 1,5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARNP de T7 100 nM, ADN de la cadena ligera de trastuzumab 2 µg/ml, ADN de la cadena pesada de trastuzumab-(His)₆ 8 µg/ml. Cada variante de trastuzumab se produjo en una escala de 100 µl en placas de 96 pocillos por duplicado con ¹⁴C para cada variante. Cabe destacar que todas las variantes de trastuzumab así producidas eran no glucosiladas.
- 10 Para controlar la síntesis de proteínas las reacciones se enriquecieron con 1-[U-¹⁴C]-leucina al 3 % (v/v) (300 mCi/mmol); GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Se determinó la supresión del codón ámbar en distintos sitios de la cadena pesada y la cadena ligera por autorradiografía de [¹⁴C] de geles reductores SDS-PAGE. La cadena pesada de longitud completa de trastuzumab y las variantes de cadena pesada de trastuzumab suprimida corrieron a 50 kD en SDS-PAGE. La cadena ligera de longitud completa de trastuzumab y las variantes de cadena ligera de trastuzumab suprimidas corrieron a 30 kD en SDS-PAGE. Las variantes de trastuzumab sin supresión (truncadas) corrieron hasta un peso molecular más bajo. La supresión de ámbar en la cadena pesada o ligera se determina por:

$$\text{supresión} = \frac{\text{intensidad de banda de la variante de TAG de la cadena pesada o suprimida}}{\text{intensidad de la banda de la cadena pesada o ligera de tipo silvestre}}$$

- 20 La intensidad de la banda fue determinada por ImageQuant (Amersham Biosciences Corp.; Piscataway, NJ). En la **Figure 7A**, se compara la eficacia de supresión de las variantes pAzF y pAzMeF. La eficacia de supresión se calcula como la intensidad de la banda de la HC variante con respecto a la intensidad de la banda de la HC de tipo silvestre o la intensidad de la banda de la LC variante con respecto a la intensidad de la banda de la LC de tipo silvestre. En la **Figura 7B**, se compara el rendimiento de IgG soluble de las variantes pAzF y pAzMeF. La cantidad de IgG se calcula de acuerdo con la fórmula: cuentas solubles/cuentas completas * intensidad de la banda de IgG / intensidad total del carril * 2 * 74008,02 Da/47 leucinas.

Ejemplo 13

- 30 Transferencia de sitios de incorporación de aminoácidos no naturales a otro anticuerpo

Para probar si los sitios de incorporación de aminoácidos no naturales pueden transferirse entre dos secuencias de IgG distintas con RFA predecibles, se evaluó un segundo anticuerpo que contenía un aminoácido no natural en sitios representativos. Para este experimento, se eligió brentuximab como el segundo anticuerpo (véase la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO:4). Se escogieron del estudio de mutagénesis de trastuzumab varios sitios que presentaban RFA variables. En la cadena pesada, los sitios correspondieron a K121, Y180, K133, S157, F126 y P127 (numeración de la UE). En la cadena ligera, los sitios correspondieron a R142, N152, Q147, E161, K149 y Q155 (numeración de la UE). El codón de terminación TAG se insertó en la secuencia de brentuximab utilizando mutagénesis dirigida basada en cambio rápido convencional, y la identidad de cada variante se confirmó mediante secuenciación de ADN. Se prepararon Minipreparaciones de ADN usando un kit Qiagen, para su uso como molde para dirigir la reacción de síntesis de proteínas sin células.

Las variantes se sintetizaron en una mezcla de reacción que contenía una proteína RF-1 sensible a OmpT y un ARNt codificante de CUA ortogonal expresado *in vivo*. Todas las variantes se aumentaron de escala hasta 9 ml en placas en flor (1,5 ml x 6 repeticiones) y se purificaron utilizando un marcador de proteínas (Emerald Bio).

La conjugación con el fármaco (DBCO-MMAF) y la preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco (los ADC) para el análisis adicional se realizó como se describe anteriormente. Los RFA se identificaron mediante el método de evaluación del perfil de CIH descrito anteriormente.

- 50 Los resultados del experimento sugieren que los sitios generalmente pueden transferirse de manera predecible entre dos IgG distintas.

Tabla 12A: Un subconjunto de variantes de HC preferentes

Variantes	RFA	
	trastuzumab	brentuximab
HC-K121 ^{TAG}	1,6	1,4
HC-Y180 ^{TAG}	1,6	0,5
HC-K133 ^{TAG}	0,7	0,8
HC-S157 ^{TAG}	0,9	1,1
HC-F126 ^{TAG}	-	-
HC-P127 ^{TAG}	-	-

Tabla 12B: Un subconjunto de variantes de LC preferentes

Variantes	RFA	
	trastuzumab	brentuximab
LC-R142 ^{TAG}	1,2	1,3
LC-N152 ^{TAG}	1,2	1,3
LC-Q147 ^{TAG}	0,8	1
LC-E161 ^{TAG}	0,8	NE
LC-K149 ^{TAG}	0,1	0,1
LC-Q155 ^{TAG}	0,1	0,1

- 5 Para caracterizar adicionalmente los conjugados de brentuximab, se seleccionaron las variantes que contenían mutaciones ámbar en las posiciones de la cadena pesada K121 o F404 o la posición de la cadena ligera N152 para el cambio de escala y la caracterización adicional. Como control, también se expresó trastuzumab conteniendo una mutación ámbar en F404. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR solapante en los nucleótidos correspondientes a las posiciones K121 y F404 en la cadena pesada y N152 en la cadena ligera, y se clonó por separado en el vector de expresión pYD317.
- 10 La mezcla de reacción sin células en la que se sintetizaron las variantes de brentuximab y trastuzumab comprendía una mezcla de extractos sin células preparados a partir de una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT, y se diseñó técnicamente una cepa de *E. coli* atenuada para RF-1 sensible a OmpT para producir un ARNt ortogonal que codifica CUA para la inserción de un aminoácido no natural en un codón de terminación ámbar. Las variantes se expresaron en una reacción de síntesis de proteínas sin células, como se describe en Zawada *et al.*,
- 15 2011, *Biotechnol. Bioeng.* 108(7)1570-1578 con las modificaciones descritas a continuación. Los extractos sin células se trataron con yodoacetamida 50 µM durante 30 minutos a TA (20 °C) y se añadieron a una premezcla que contenía todos los otros componentes excepto el ADN que codifica las variantes de interés. La concentración final en la reacción de síntesis de proteínas fue del 30 % de extracto celular, para-azido metilfenilalanina (pAzMeF) 1 mM (RSP Amino Acids), aminoacil ARNt sintasa específica de pAzMeF de *M jannaschii* (FRS) 0,37 mg/ml, GSSG 2 mM,
- 20 PDI 0,29 mg/ml (Mclab), DsbC de *E. coli* 30 µg/ml, glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1,2 mM, 0,86 mM de cada GMP, UMP y CMP, aminoácidos 2 mM (excepto 0,5 mM para tirosina y fenilalanina), oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermina 1,5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARNp de T7 100 nM. Se analizaron las relaciones de plásmidos para la HC con respecto al de la LC para encontrar la condición óptima: 3:1, 2:1, 1:1 y 1:2. La concentración total de plásmido se mantuvo constante a 10 µg/ml. Después de la adición del molde de ADN, las reacciones sin células se incubaron a 30 °C durante 12 h en placas de Petri, seguido de un análisis de ensayo con 14C. El rendimiento máximo se logró en una proporción de 1:1. Se llevaron a cabo reacciones sin células de 10 ml en esta condición.
- 25 Para purificar las variantes, en primer lugar se diluyeron 1:0,5 10 ml de reacción sin células en bruto para cada variante, con tampón de equilibrio (fosfato de sodio 50 mM, pH 7) y se centrifugaron a 11.000x g durante 30 minutos. Después, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,45 micrómetro antes de cargarlo con un tiempo de residencia de 2 minutos en un MabSelect Sure HiTrap de 1 ml preequilibrado (GE Lifesciences) para capturar las variantes de IgG. Después, se lavó la columna con 7,5 VC (volumen de la columna) de tampón de lavado 1 (fosfato de sodio 100 mM y arginina 800 mM, pH 7) y seguido de 7,5 VC de tampón de lavado 2 (fosfato de sodio 50 mM y Triton X-100 al 0,5 % (v/v), pH 7,3). Después de lavar con 7,5 VC de tampón de equilibrio, cada variante se eluyó con 4VC de tampón de elución (citrate de sodio 100 mM y arginina 300 mM, pH 3). El agrupamiento de la elución se ajustó a pH 7 mediante la adición de Tris 1 M al 30 % (v/v), pH 9.
- 30 Al agrupamiento de la elución recogido se le cambió el tampón a PBS a través de diálisis durante una noche en unidades de Slide-A-Lyzer de 10 kD (Pierce). El material dializado se concentró a continuación utilizando una unidad de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore) a una concentración de 5-10 mg/ml.
- 35 Las variantes purificadas se conjugaron de la siguiente manera. DBCO-MMAF 2 (ACME Bioscience; Palo Alto, CA) se disolvió en DMSO hasta una concentración final de 5 mM. El compuesto se diluyó con PBS a una concentración de 1 mM y después se añadió a las variantes de trastuzumab purificadas en tampón de elución IMAC hasta alcanzar la concentración final de fármaco de 100 µM. La mezcla se incubó a TA (20 °C) durante 17 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de azida sódica a una concentración final de 100 mM y el tampón se cambió utilizando placas de Zeba (Thermo Scientific; Waltham, MA) equilibradas en PBS 1X. El RFA para las variantes no glicosiladas se determinó mediante LC-MS de la siguiente manera. **ADCs mediante LCMS** Las muestras se procesaron en un sistema Acquity UPLC de Waters acoplado a un Xevo QTOF. Las proteínas se separaron en una columna PLRP-S de Agilent (2,3x50 mm, 5 µm, 4000 Å) a 80 °C. Fases móviles: A: ácido fórmico al 0,1 % en agua; b:
- 45 isopropanol:acetonitrilo 20:80, ácido fórmico al 0,1 %. Las muestras se desalaron en la columna durante 0,4 minutos en B al 10 % seguido de un gradiente escalonado de B al 30 % a B al 40 % durante 7 minutos, de B al 40 % a B al 60 % durante 3 minutos. Los datos se adquirieron durante toda la elución de LC usando un voltaje de cono de 35 V.
- 50 Los espectros se analizaron utilizando el programa informático MassLynx. Los valores de la RFA se calcularon

como un promedio ponderado y se muestran en la Tabla 13

Tabla 13: Valores de la RFA para los ADC de Adcetris

Variante	Fármaco	RFA
IgG Brentuximab no glucosilado HC-F404	BCO-MMAF 2	.87
IgG Brentuximab glucosilado HC-K121	BCO-MMAF 2	.79
IgG Brentuximab glucosilado LC-N152	BCO-MMAF 2	.74
IgG Trastuzumab no glucosilado HC-F404	DBCO-MMAF 2	1,97

- 5 A continuación, se midieron la unión celular y las actividades de destrucción de células de las variantes de la siguiente manera. Las líneas celulares Karpas 299 y L540 se obtuvieron de la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ) y las líneas celulares SKBR3 y Raji se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las células se cultivaron en medio RPMI 1650 (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) que contiene con suero fetal bovino inactivado por calor al 20 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células SKBR3 se cultivaron en DMEM:F-12 nutritiva de Ham (50:50), medio de alta glucosa (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 %, Glutamax 2 mM y penicilina/estreptomina 1x. Todas las células se cultivaron y se mantuvieron a 37 °C en un incubador con CO₂ al 5 %.
- 10 Las SKBR3 se pasaron mediante lavado con solución salina equilibrada con fosfato (PBS) sin calcio/magnesio y se recogieron con HyQTase (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA).

Las actividades de destrucción de células de las variantes de Trastuzumab y Brentuximab (Adcetris) se midieron utilizando el ensayo de proliferación celular CellTiter-Glo®. Brevemente, Se sembraron en placas 10⁴ células en suspensión o 3x10³ células SKBR3 en 40 µl por pocillo en una placa tratada con TC blanca de media superficie de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 2 horas antes de añadir los anticuerpos. Los anticuerpos se formularon en los respectivos medios de cultivo celular y se esterilizaron por filtración con filtros en tubos de centrifuga Costar Spin-X® de acetato de celulosa de 0,45 µm (Corning; Tewksbury, MA). Se añadieron a las células 40 µl de anticuerpo no conjugado, de anticuerpo conjugado con AB4285 o de fármaco libre AB4285 y se cultivaron durante 3 días o 5 días para las células en suspensión y las células SBR3, respectivamente. La viabilidad celular se midió añadiendo 80 µl de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp.; Madison, WI) a cada pocillo y se procesó siguiendo las instrucciones del producto. La luminiscencia se midió con el lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad utilizando células no tratadas como controles y representaron frente a la concentración de anticuerpo. La CI₅₀ se calculó a partir de la pendiente variable (4 parámetros) de la ecuación de regresión no lineal, log (inhibidor) frente a respuesta, usando el programa informático estadístico, Prism (informático estadístico GraphPad; San Diego, CA). Los resultados se muestran en las Figura 8 y 9, y la Tabla 14.

Tabla 14: Destrucción de células por las variantes de Brentuximab y Trastuzumab

ADC	Sitio	Línea celular		
		arpas	540	SKBR3
		C50	C50	C50
		nM)	nM)	nM)
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C F404	.078	.22	
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C K121	.040	.12	
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C N152	.037	.12	
Trastuzumab glucosilado DBCO-MMAF 2	C F404			.043
fármaco libre DBCO-MMAF 2		43	46	78

- 35 Se midieron las afinidades de unión a células de las variantes de trastuzumab y brentuximab utilizando un ensayo basado en FACS. Brevemente, se sembraron en una placa de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U (Greiner Bio-One 2x10⁵ células Karpas 299 o L540 en 25 µl de tampón de unión, que consiste en PBS que contiene seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 % (Invitrogen; Carlsbad, CA) y azida de sodio al 0,09 % (Sigma; St. Louis, MO); Monroe, NC). Los anticuerpos se formularon en tampón de unión y se prepararon diluciones seriadas al doble en una placa de 96 pocillos distinta. Se añadió a las células un volumen igual de anticuerpos diluidos y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de unión para eliminar los anticuerpos no unidos. Para la detección de anticuerpos secundarios, se preparó anti IgG humana de cabra, conjugada con Alexa-488 5 µg/ml (Invitrogen; Carlsbad, CA) en tampón de unión y se añadieron a las células 50 µl, y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión y se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACScan® (Cytex; Fremont, CA) equipado con un micro muestreador automatizado de 96 pocillos (Cytex; Fremont, CA). Los datos se adquirieron y analizaron utilizando FlowJo (Tree Star; Ashland, OR). Las lecturas de intensidad de fluorescencia media se expresaron como % de unión

normalizando con respecto a los valores máximos promediados de IFM y los datos se representaron frente a la concentración de anticuerpos. La afinidad de unión se calculó a partir de la ecuación de regresión no lineal de unión de saturación, de un sitio - unión total utilizando el programa informático Prism. Los resultados se muestran en las Figura 10 y la Tabla 15.

5

Tabla 15: Unión a células de las variantes de Brentuximab

ADC	Sitio	Línea celular	
		arpas	540
		d (nM)	d (nM)
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C F404	,46	,81
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C K121	,52	,3
Brentuximab glucosilado DBCO-MMAF 2	C N152	,50	,0

Ejemplo 14: Conjugados de anticuerpo-fármaco en armazones alternativos: Formatos de scFv

10 Para demostrar la viabilidad de utilizar scFv como armazón alternativo para el ADC, se clonó el ADN que codifica el scFv trastuzumab (VL_VH) con un codón ámbar en el vector de expresión pYD317. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR solapante en los nucleótidos correspondientes al aminoácido serina en la posición (-1).

15 Para expresar el scFv, se descongelaron a temperatura ambiente extractos sin células y se incubaron con yodoacetamida 50 μ M durante 30 min. Las reacciones sin células se realizaron a 30 °C durante hasta 10 h, conteniendo extracto tratado con yodoacetamida al 30 % (v/v) con glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1,2 mM, 0,86 mM de cada GMP, UMP y CMP, aminoácidos 2 mM para los 18 aminoácidos, excepto tirosina y fenilalanina, que se añadieron a 0,5 mM, oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermina 1,5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARNP de T7 100 nM, DsbC de *E. coli* 1,3 μ M, glutatión oxidado (GSSG) 2 mM, plásmido de scFv 10 μ g/ml, ARNt de m.j. producido *in vivo* 15 μ M, ARN sintasa de m.j. 5 μ M y pAzido fenilalanina 1 mM (pN3F). El scFv de tipo silvestre se expresó como control.

25 scFv(-1)pN3F y scFv de tipo silvestre se purificaron mediante Proteína L seguido de SEC. Se incubó scFv (-1) 5 μ M con el reactivo DBCO-MMAF 50 μ M mostrado en la Figura 1 durante 16 horas a temperatura ambiente. El fármaco libre en exceso se eliminó mediante una columna de desalado de zeba.

30 Después, se realizó una cromatografía de interacción hidrófoba para cuantificar las muestras y determinar las relaciones de fármaco-anticuerpo de la siguiente manera. Las muestras y los patrones se diluyeron 1:1 en sulfato de amonio 3 M (EMD Chemical), fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 (Mallinckrodt) preparado en agua MilliQ. Se equipó un sistema de HPLC Dionex con una columna de LLC TSK-gel Butyl-NPR® (4,6 mm x 3,5 cm) de Tosoh Bioscience LLC con una temperatura de compartimento de la columna de 30 °C. La fase móvil A fue fosfato de amonio 1,5 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. La fase móvil B fue fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 en agua:Alcohol isopropílico (Honeywell) 80:20. La fase móvil se suministró a un caudal de 1,0 ml/minuto. La separación se realizó con un gradiente lineal del 15 % de fase móvil B al 100 % de fase móvil B en 10 minutos. Los datos de UV se adquirieron a 214 nm. Las áreas de los picos se cuantificaron utilizando el programa informático Chromeleon (Thermo) para calcular la relación de fármaco con respecto a anticuerpo (RFA).

40 Para evaluar la unión de las variantes de armazón trastuzumab conjugadas, se realizó un ensayo de unión a células que expresan HER2 de la siguiente manera. La unión de las variantes de conjugado purificadas a HER2 en células SKBR3, que sobreexpresan el producto del gen HER2/c-erb-2, con más de 1,5 millones de copias de receptores por célula (ATCC n.º HTB-30, Manassas, VA) se comparó con Herceptin® con calidad clínico, trastuzumab no glucosilado producido por síntesis de proteínas sin células o IgG1 de suero humano como control negativo (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). las células SKBR3 se cultivaron en DMEM:F-12 de Ham (50:50), alto contenido de glucosa (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin calcio y magnesio, se recogieron con HYQ@TASE™ (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Se incubaron un total de 200.000 células por muestra en un volumen total de 10 μ l con diluciones seriadas de las variantes de armazón alternativo de conjugados, HERCEPTIN® de calidad clínica o trastuzumab no glucosilado preparado en 10 μ l de tampón de FACS (tampón DPBS complementado con seroalbúmina bovina al 1 %). Las células más anticuerpo o ADC se incubaron durante 60 minutos en hielo. Se utilizaron como controles células no teñidas, IgG1 humana (control de isotipo) y anticuerpo secundario (cabra anti-IgG humana). Para detectar HERCEPTIN® o la unión de trastuzumab no glucosilado, las células se lavaron dos veces con tampón de FACS enfriado en hielo y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana marcado con Alexa 647 5 μ g/ml (Invitrogen; Carlsbad, CA) en hielo durante 1 hora. La unión celular de la variante de armazón alternativo se detectó incubando las células en hielo durante 1 h con cualquiera de Proteína L marcada con Alexa 647 (Pierce) 5 μ g/ml o anti-Fc humana de cabra marcada con Alexa 647 (Invitrogen; Carlsbad, CA). Todas las muestras se

lavaron utilizando un tampón de FACS y se analizaron utilizando un sistema FACS Calibur de BD (BD Biosciences; San José, CA).

5 Las intensidades medias de fluorescencia se ajustaron utilizando un análisis de regresión no lineal con una ecuación de un sitio de unión específica utilizando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, programa informático; San Diego, CA). Los datos se expresaron como IMF relativo frente a la concentración de anticuerpo o variante de anticuerpo en nM.

10 A continuación, se midieron los efectos de las variantes de armazón alternativo de conjugados sobre la destrucción celular con un ensayo de proliferación celular de la siguiente manera. Se obtuvieron células SKBR3 de la ATCC y se mantuvieron en DMEM:F-12 de Ham (50:50), alta glucosa (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Las células adherentes se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) sin calcio y magnesio, se recogieron con HYQ@TASE™ (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA). Se sembraron un total de 10^3 células en un volumen de 15 40 μ l en una placa de poliestireno blanco de fondo plano de 96 pocillos con la mitad de la superficie. Se permitió que las células se adhirieran durante una noche a 37 °C en un incubador con CO₂. Las variantes de ADC se formularon a una concentración 2x en medio DMEM/F12 y se filtraron a través de placas de filtro MultiScreen_{HTS} de 96 pocillos (Millipore; Billerica, MA). Se añadieron a los pocillos de tratamiento las variantes de armazón alternativo de conjugados esterilizadas con filtro, HERCEPTIN® o trastuzumab no glucosilado y las placas se cultivaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 120 horas. Para la medición de la viabilidad celular, se añadieron 80 μ l de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp.; Madison, WI) a cada pocillo y se procesaron las placas según las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad utilizando células no tratadas como controles. Los datos se ajustaron con un análisis de regresión no lineal, usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros de pendiente variable para log(inhibidor) frente a la respuesta, usando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, programa informático; San Diego, CA). Los datos se expresaron como la viabilidad celular relativa, el % de contenido de ATP frente a la dosis de ADC en nM.

20 Los resultados del análisis de CIH, la unión a células y los experimentos de destrucción celular se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16: Unión a células, destrucción de células y RFA de scFv

	Unión a células SKBR3	Destrucción de células SKBR3	
Armazón	CI ₅₀ , nM	Kd, nM	RFA mediante ensayo de CIH
Trastuzumab sin glucosilar	5	NE	NE
scFv(-1) TS	15	NE	NE
scFv(-1) conjugado	14	0,48	0,77

35 Ejemplo 15: Conjugados de anticuerpo-fármaco en armazones alternativos: Formatos de scFv-Fc

Para demostrar la viabilidad de utilizar scFv Fc como armazón alternativo para el ADC, se clonó el ADN que codifica el scFv Fc de trastuzumab (VL_VH_Fc) con un codón ámbar en el vector de expresión pYD317. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR solapante en los nucleótidos correspondientes al aminoácido serina en la posición (-1), Fc R355, Fc N389 y Fc F404 (numeración del índice de la UE).

40 Las condiciones de la SPSC fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 14, excepto que se añadió PDI de levadura 5 μ M. El scFv Fc de tipo silvestre se expresó como control.

45 Para conjugar scFv-Fc no glucosilado, las proteínas se purificaron en primer lugar con Proteína A, seguido de SEC. Se incubó pN3F 5 μ M que contenía scFv-Fc con DBCO-MMAF 50 μ M durante 16 horas a temperatura ambiente. El fármaco libre en exceso se eliminó mediante una columna de desalado de zeba.

50 Adicionalmente, se incorporó la pAzido Metil Fenilalanina a scFv Fc en los sitios de R355, N389 y F404, respectivamente. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 14, excepto que se utilizaron pCiano m.j. de FRS 1 μ M y pAzido Metil Phe 1 mM para reemplazar la pareja de m.j. de FRS y pAzido Phe. La proteína purificada por proteína A se conjugó después con el reactivo DBCO-MMAF 2 (DBCO-MMAF 2). La estructura de DBCO-MMAF 2 se muestra en la Figura 11.

55 A continuación, Se realizó LC-MS para cuantificar las muestras y determinar las relaciones de fármaco-anticuerpo de la siguiente manera. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (CHIP-Cube nanoLC, Agilent) acoplada a un espectrómetro de masas qTOF (Agilent 6520). Las proteínas se separaron en un chip de HPLC de fase inversa (PLRP-S, 4000 Å, 5 μ ; Columna de enriquecimiento: 25 mm; Columnas de separación: 150 mm x 75 μ m) con ácido fórmico al 0,1 % en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo + alcohol

isopropílico (80:20 v/v, disolvente B). Los datos se procesaron utilizando el programa informático cualitativo MassHunter (Agilent). Los datos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: RFA y unión a, y destrucción, de células de las variantes de scFv-Fc

	Unión a células SKBR3	Destrucción de células SKBR3	RFA por LCMS
Armazón	Kd, nM	Cl ₅₀ , nM	RFA
Herceptin®	12	NE	NE
Trastuzumab no glucosilado	8,1	NE	NE
scFv-Fc de Her	6,0	NE	NE
scFv-Fc (-1) pN ₃ F DBCO-MMAF	6,8	0,011	1,86
scFv-Fc (R355) pN ₃ F DBCO-MMAF	6,9	0,015	1,77
scFv-Fc (N389) pN ₃ F DBCO-MMAF	5,4	0,010	1,53
scFv-Fc (N389) pN ₃ CH ₂ F	3,0		1,97
DBCO-MMAF 2			
scFv-Fc (R355) pN ₃ CH ₂ F DBCO-MMAF 2	5,0	0,055	1,97
scFv-Fc (F404) vH-vL pN ₃ CH ₂ F DBCO-MMAF 2		0,05	1,99
scFv-Fc (F404) vL-vLH pN ₃ CH ₂ F DBCO-MMAF 2		0,068	1,97

5

Se midió la estabilidad *in vivo* de los conjugados de ADC de enlazadores de fármacos mediante la dosificación de 2 mg/kg de los conjugados scFv-Fc DBCO-MMAF 2 respectivos en ratones Beige desnudos Xid. se recogió plasma mediante hemorragias terminales a los 30 minutos, d 3, d 7, d 14 y d 21 a partir de n=2 animales para cada punto de tiempo. Los ADC de ScFv-FC en circulación totales se capturaron mediante (Fab)₂ anti-IgG humana de cabra-Biotina, específica para el fragmento Fcγ. El complejo fue precipitado con estreptavidina Mag Sepharose. El complejo capturado se lavó para eliminar la unión no específica y se eluyó con ácido fórmico al 1 %. El eluato neutralizado se analizó mediante LCMS intacta. Los resultados indican que scFv-Fc (N389) pN₃CH₂F DBCO-MMAF 2 y scFv-Fc (R355) pN₃CH₂ F DBCO-MMAF 2 son estables hasta 28 días.

10

15

A continuación, las propiedades farmacocinéticas de los ADC de ScFv-Fc se analizaron en ratones beige desnudos xid. Se les administró a los animales por vía intravenosa un nivel de dosis de aproximadamente 2,0 mg/kg de scFv-Fc R355 y scFv-Fc N389. Las concentraciones plasmáticas, de las que se tomaron muestras hasta los 28 días, se determinaron mediante inmunoensayo y los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando un enfoque no compartimentado con WinNonlin 'v' 5.2 (Pharsight, CA). Los resultados se muestran en la Figura 12.

20

Para evaluar la eficacia *in vivo* de los ADC de scFv-Fc, se inocularon células de tumor de mama humano KPL-4 en las almohadillas de grasa mamarias de ratones beige SCID (Charles River Laboratories). Se inyectaron un total de 3 millones de células por ratón, suspendidas Matrigel sin rojo fenol al 50 % (Becton Dickinson Bioscience) mezclado con medio de cultivo. Una vez que se alcanzó el tamaño del tumor, todos los animales se asignaron al azar en grupos de tratamiento, de forma que el volumen medio del tumor para cada grupo fue de 100 -150 mm³.

25

Se administró Trastuzumab (30 mg/kg) i.p. (inyección única en el día 0 de tratamiento), seguido de (15 mg/kg) por semana durante 3 semanas. Variante de scFv-Fc Trastuzumab 2AAnn N389 no glucosilado DBCO-MMAF 2 15 mg/kg (872 ug MMAF/m², RFA 1,901), Se proporcionaron la variante HC-S136 de Trastuzumab 2AAnn no glucosilado (15 mg/kg) (no conjugado), vehículo (PBS) y el fármaco libre (0,54 mg/kg) por vía i.v (inyección única en el día 0 de tratamiento). Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 13a.

30

En otro experimento, se administraron scFv-Fc F404 vL-vH DBCO-MMAF 2 (15 mg/kg), scFv-Fc F404 vH-vL DBCO-MMAF 2 (15 mg/kg), Trastuzumab-CF HC F404 DBCO-MMAF 2 (15 mg/kg), Trastuzumab-CF (15 mg/kg) y vehículo mediante inyección i.v. única en el día 0. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 13b.

35

En ambos experimentos, todos los grupos de tratamiento consistieron en 10 animales por grupo, y el tamaño del tumor se controló dos veces a la semana usando una medición con calibrador. Los ratones se alojaron en jaulas microaislantes convencionales de roedores. Se ajustaron los controles ambientales para las salas de los animales para mantener una temperatura de 70 °F, una humedad relativa del 40 % al 60 %, y un ciclo de aproximadamente 14 h de luz/10 h de oscuridad.

40

Los resultados de este experimento demuestran que los ADC conjugados en las posiciones N389 y F404 fueron eficaces en un animal para remitir de forma duradera el tamaño del tumor. Es de particular interés, que los conjugados scFv-Fc F404 lograron una regresión por debajo de los valores basales, lo que demuestra una eficacia particular para este armazón en un modelo de tumor sólido.

45

Ejemplo 16: ADC a modo de ejemplo específicos para CD74 y Her2 y con combinaciones adicionales de enlazadores-carga útil a modo de ejemplo

5 Este ejemplo proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo preparados con un anticuerpo específico para CD74 y que contienen distintas combinaciones de enlazadores-carga útil a modo de ejemplo, como se describe en el presente documento. Este ejemplo proporciona adicionalmente conjugados de anticuerpo-fármaco a modo de ejemplo preparados a partir de trastuzumab conjugado con determinadas combinaciones de enlazadores-carga útil.

10 La secuencia de proteínas de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD74 utilizado en este ejemplo se proporciona como la SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente. La secuencia de la cadena pesada incluye una etiqueta 6-His C-terminal para ayudar con la purificación. Los codones ámbar en las posiciones que codifican HC K212, HC S136, HC F241, HC F404, LCS7 o LC N152 se introdujeron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 13. Los anticuerpos anti-CD74 que contenían p-metilazido-Phe se expresaron y purificaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 13. Las variantes de trastuzumab que contenían p-metilazido-Phe en las posiciones HC S136 o HC F404 también se expresaron y purificaron como se describe en el Ejemplo 13.

15 A continuación, el anti-CD74 o las variantes de trastuzumab se conjugaron con DBCO-MMAF 2 (Figura 11A), DBCO-DM4 (Figura 11B), DBCO-DM4 2 (Figure 11C) o DBCO-MMAE (Figura 11D). El método utilizado para realizar las reacciones de conjugación entre las variantes de anticuerpos y las combinaciones de enlazador-carga útil fue como se describe en el Ejemplo 13.

20 Las relaciones de fármaco-anticuerpo (RFA) de los ADC se determinaron a continuación por LC-MS, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 13. Cabe señalar que el método LC-MS para las muestras de anti-CD74 no se había optimizado para este anticuerpo; los resultados del análisis contenían picos que se solapaban con especies las no conjugadas, disminuyendo artificialmente la RFA de estas muestras. La RFA de las variantes de ADC preparadas en este ejemplo, por lo tanto, mostró una buena concordancia con los ADC que contenían un AAnn en los sitios correspondientes analizados en los Ejemplos 1-15. Los resultados del análisis de la RFA se presentan a continuación en la Tabla 18.

25 A continuación, las variantes de ADC se usaron en experimentos de destrucción de células para determinar sus valores de CI_{50} . Las variantes de Trastuzumab se analizaron como se describe en el Ejemplo 13. Se midieron los efectos de las variantes de anti-CD74 de conjugados sobre la destrucción celular mediante un ensayo de proliferación celular. Se obtuvieron células SU-DHL-6 y NCI-H929 de la ATCC y se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA) complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 20 % (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), glutamax 2 mM (Invitrogen; Carlsbad, CA) penicilina/estreptomicina 1x (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). Se recogieron células SU-DHL-6 y NCI-H929 y se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración final de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se sembraron un total de 20×10^3 células en un volumen de 40 μ l en cada pocillo de una placa de poliestireno blanco de fondo plano de 96 pocillos con la mitad de la superficie.

30 Las variantes de ADC se formularon a una concentración 2x en medio RPMI-1640 completo y se filtraron a través de placas de filtro MultiScreen_{HTS} de 96 pocillos (Millipore; Billerica, MA). Se añadieron a los pocillos de tratamiento los ADC esterilizados con filtro, HERCEPTIN o trastuzumab no glucosilado y las placas se cultivaron a 37 °C en un incubador de CO2 durante 72 horas. Para la medición de la viabilidad celular, se añadieron 80 μ l de reactivo Cell Titer-Glo® (Promega Corp. Madison, WI) a cada pocillo, y las placas se procesaron según las instrucciones del producto. La luminiscencia relativa se midió en un lector de placas ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Las lecturas de luminiscencia relativa se convirtieron a % de viabilidad utilizando células no tratadas como controles. Los datos se ajustaron con un análisis de regresión no lineal, usando la ecuación de ajuste de 4 parámetros de pendiente variable para log(inhibidor) frente a la respuesta, usando GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, programa informático; San Diego, CA). Los datos se expresaron como la viabilidad celular relativa, el % de contenido de ATP frente a la dosis de ADC en nM. Los resultados de los ensayos de destrucción celular se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18: Valores de RFA e CI_{50} para los ADC a modo de ejemplo de Anti-CD74 y Anti-HER2

Anticuerpo	Conjugado farmacológico	Sitio	RFA	CI_{50}
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	HC K121	1,601	0,122
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	HC S136	1,601	0,100
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	HC F241	1,58	0,078
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	HC F404	1,631	0,137
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	LC S7	1,543	0,120
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAF 2	LC N152	1,457	0,130
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	HC K121	1,572	0,191
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	HC S136	1,61	0,271
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	HC F241	1,581	0,187
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	HC F404	1,531	0,253

(continuación)

Anticuerpo	Conjugado farmacológico	Sitio	RFA	CI ₅₀
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	LC S7	1,509	0,293
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4	LC N152	1,474	0,281
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	HC K121	1,578	0,215
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	HC S136	1,589	0,215
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	HC F241	1,612	0,196
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	HC F404	1,63	0,154
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	LC S7	1,561	0,291
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-DM4 2	LC N152	1,495	0,235
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	HC K121	1,811	0,166
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	HC S136	1,752	0,242
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	HC F241	1,81	0,238
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	HC F404	1,572	0,235
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	LC S7	1,581	0,224
Anticuerpo anti-CD74	DBCO-MMAE	LC N152	1,616	0,251
Trastuzumab	DBCO-DM4	HC F404	0,036	1,84
Trastuzumab	DBCO-DM4	HC S136	0,038	1,82
Trastuzumab	DBCO-DM4 2	HC F404	0,043	1,94
Trastuzumab	DBCO-DM4 2	HC S136	0,038	1,82

5 El Ejemplo 17 demuestra adicionalmente que el sitio de incorporación de un AAnn en un anticuerpo puede transferirse de manera razonablemente predecible entre anticuerpos. Adicionalmente, la identidad del enlazador y la carga útil no parece afectar significativamente a la eficacia de conjugación o la RFA del ADC resultante, lo que demuestra una previsibilidad razonable de que una dada combinación de carga útil-enlazador puede conjugarse con un anticuerpo que contenga un aminoácido no natural en uno de los sitios preferentes.

10 **Listado de secuencias**

10 <210> SEQ ID NO: 1
 <211> LONGITUD: 449
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 15 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: la secuencia se sintetiza
 <400> SECUENCIA: 1

ES 2 718 478 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
				20					25					30
Asp	Thr	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr
				50					55					60
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr
				95					100					105
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115					120
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
				125					130					135
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				140					145					150
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
				155					160					165
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				170					175					180
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				185					190					195
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
				200					205					210
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
				215					220					225
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
				230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				275					280					285
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
				290					295					300
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				305					310					315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
				320					325					330
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				335					340					345
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
				350					355					360
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
				365					370					375
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				380					385					390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				395					400					405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				410					415					420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				425					430					435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
				440					445					

ES 2 718 478 T3

<210> SEQ ID NO: 2
 <211> LONGITUD: 214
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERÍSTICA:
 <223> OTRA INFORMACIÓN: La secuencia se sintetiza.
 <400> SECUENCIA: 2

5

```

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

10

SEQ ID NO: 3

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

MQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGK
 ATLTVDTSSTAFMQLSSLTSEDVAVYFCANYGNWFAYWGQGTQVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSHHHHHH

15

SEQ ID NO: 4

> Secuencia de la cadena ligera de brentuximab: LC

MDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIIYAASNLESGIPARFS
 GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSFNRGEC

20

SEQ ID NO: 5

>Secuencia de la cadena pesada de anti-CD74: HC

ES 2 718 478 T3

M Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G
M H W V R Q A P D K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R
F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G G T
L V R G A M Y G T D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A
P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A
P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E
K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H
Y T Q K S L S L S P G K G G S H H H H H H

SEQ ID NO: 6

>Secuencia de la cadena ligera de anti-CD74

5

M D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L
A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G G
T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K
D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S
P V T K S F N R G E C

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> SUTRO BIOPHARMA, INC.
- <120> ANTICUERPOS QUE COMPRENEN RESTOS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES DE LOCALIZACIÓN ESPECÍFICA, MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN Y MÉTODOS PARA SU USO
- 15 <130> 108843.00032
- <140> EP 13730764.1
- <141> 26-11-2014
- 20 <150> PCT/US2013/044843
- <151> 07-06-2013
- <150> US 61/725.433
- <151> 12-11-2012
- 25 <150> US 61/657.556
- <151> 08-06-2012
- <160> 8
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 449
- 35 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cadena pesada de trastuzumab
- 40 <400> 1

ES 2 718 478 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ES 2 718 478 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

ES 2 718 478 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de trastuzumab

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

5

10

ES 2 718 478 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de brentuximab con etiqueta de 6X-His

<400> 3

Met Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 20 25 30

Tyr Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Phe Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

5

10

ES 2 718 478 T3

		100		105		110												
Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro			
		115						120					125					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly			
	130					135					140							
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn			
145					150					155					160			
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln			
				165					170					175				
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser			
			180					185					190					
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser			
		195					200					205						
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr			
	210					215					220							
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser			
225					230					235					240			
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg			
				245					250					255				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro			
			260					265					270					
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			
		275					280					285						
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val			
	290					295					300							
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr			
305					310					315					320			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr			
				325					330					335				
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu			
			340					345					350					

ES 2 718 478 T3

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

Gly Gly Ser His His His His His His
 450 455

<210> 4
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera de brentuximab

10

<400> 4

ES 2 718 478 T3

Met Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
20 25 30

Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
65 70 75 80

His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
85 90 95

Asn Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 5
<211> 463
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 718 478 T3

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti-CD74 con etiqueta de 6X-His

<400> 5

5

Met Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 20 25 30

Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

ES 2 718 478 T3

Cys Ala Arg Gly Gly Thr Leu Val Arg Gly Ala Met Tyr Gly Thr Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

ES 2 718 478 T3

	340					345					350					
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			355					360					365			
	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		370					375					380				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	385					390					395					400
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					405					410					415	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				420					425					430		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			435					440					445			
	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His
		450					455						460			

<210> 6
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera de anti-CD74

10

<400> 6

ES 2 718 478 T3

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
 20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador T7

ES 2 718 478 T3

<400> 7
taatacgact cactatagg 19

5 <210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador T7 term

<400> 8
gctagttatt gctcagcg 18

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de la clase IgG que comprende una cadena polipeptídica que tiene uno o más restos de aminoácido no naturales en sitios específicos seleccionados del grupo que consiste en el resto de la cadena ligera L7 de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat o Chothia, los restos de la cadena pesada H404, H121, H180 y H136 de acuerdo con el esquema de numeración de la UE, o una variante modificada postraduccionalmente del mismo, en donde la modificación postraducciona es un enlace disulfuro intercatenario, un enlace disulfuro intracatenario, glucosilación unida en N, fosforilación, glucosilación unida en O, metilación, acetilación, lipidación, anclaje de GPI, miristoilación o prenilación.

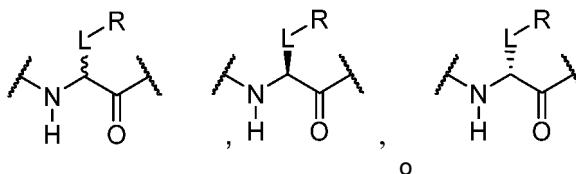
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena polipeptídica que tiene al menos el 70 %, 80 % o 90 % de homología con la SEQ ID NO: 1 y que tiene uno o más restos de aminoácidos no naturales en sitios específicos seleccionados del grupo que consiste en los sitios que corresponden a los restos 407, 124, 183, y 139 del polipéptido de cadena pesada representativo de acuerdo con la SEQ ID NO:1, o una variante modificada postraduccionalmente del mismo, como se define en la reivindicación 1.

3. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cadena polipeptídica es una cadena ligera de un tipo seleccionado de λ y κ .

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es de una subclase seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho resto de aminoácido no natural comprende una fracción seleccionada del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, azido y alquinilo.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada resto de aminoácido no natural está de acuerdo con la fórmula



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

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en donde R es un grupo reactivo, una fracción terapéutica o una fracción de marcaje, opcionalmente en donde cada R es un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en amino, carboxi, acetilo, hidrazino, hidrazido, semicarbazido, sulfanilo, azido y alquinilo, opcionalmente en donde cada L es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en un enlace, alquileo, alquileo sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

9. Un conjugado de anticuerpo que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores unido a una o más fracciones terapéuticas o fracciones de marcaje.

10. El conjugado de anticuerpo de la reivindicación 9 que comprende dicho anticuerpo unido a uno o más fármacos o polímeros, una o más fracciones terapéuticas o fracciones de marcaje, o uno o más dominios de unión monocatenarios (scFv), opcionalmente en donde dicho anticuerpo está unido a dichas una o más fracciones terapéuticas o fracciones de marcaje a través de uno o más enlazadores.

11. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha composición es sustancialmente pura.

12. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho anticuerpo es al menos el 95 % en masa de la masa total de anticuerpo de dicha composición.

13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia.

Figura 1

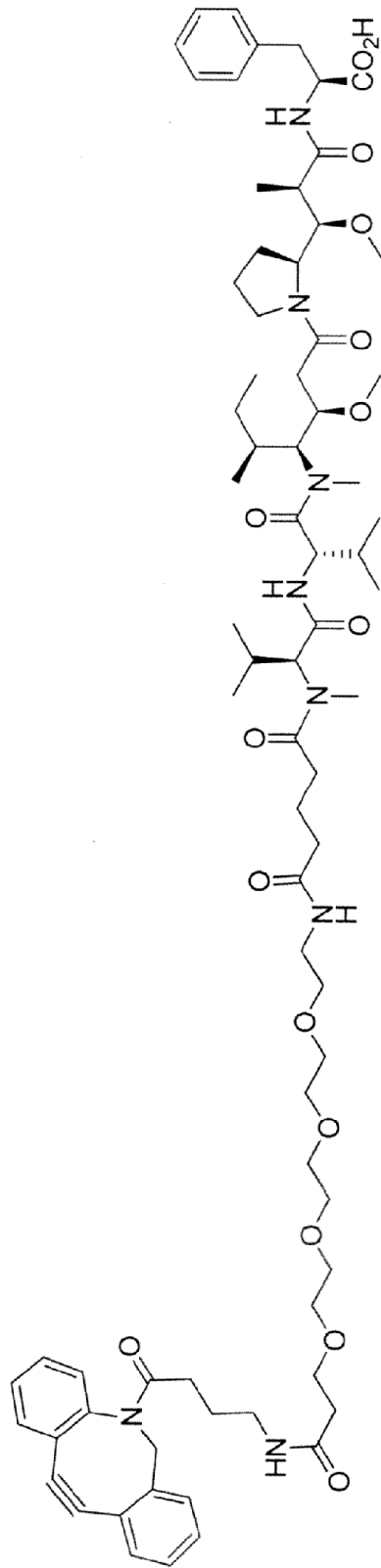


Figura 2

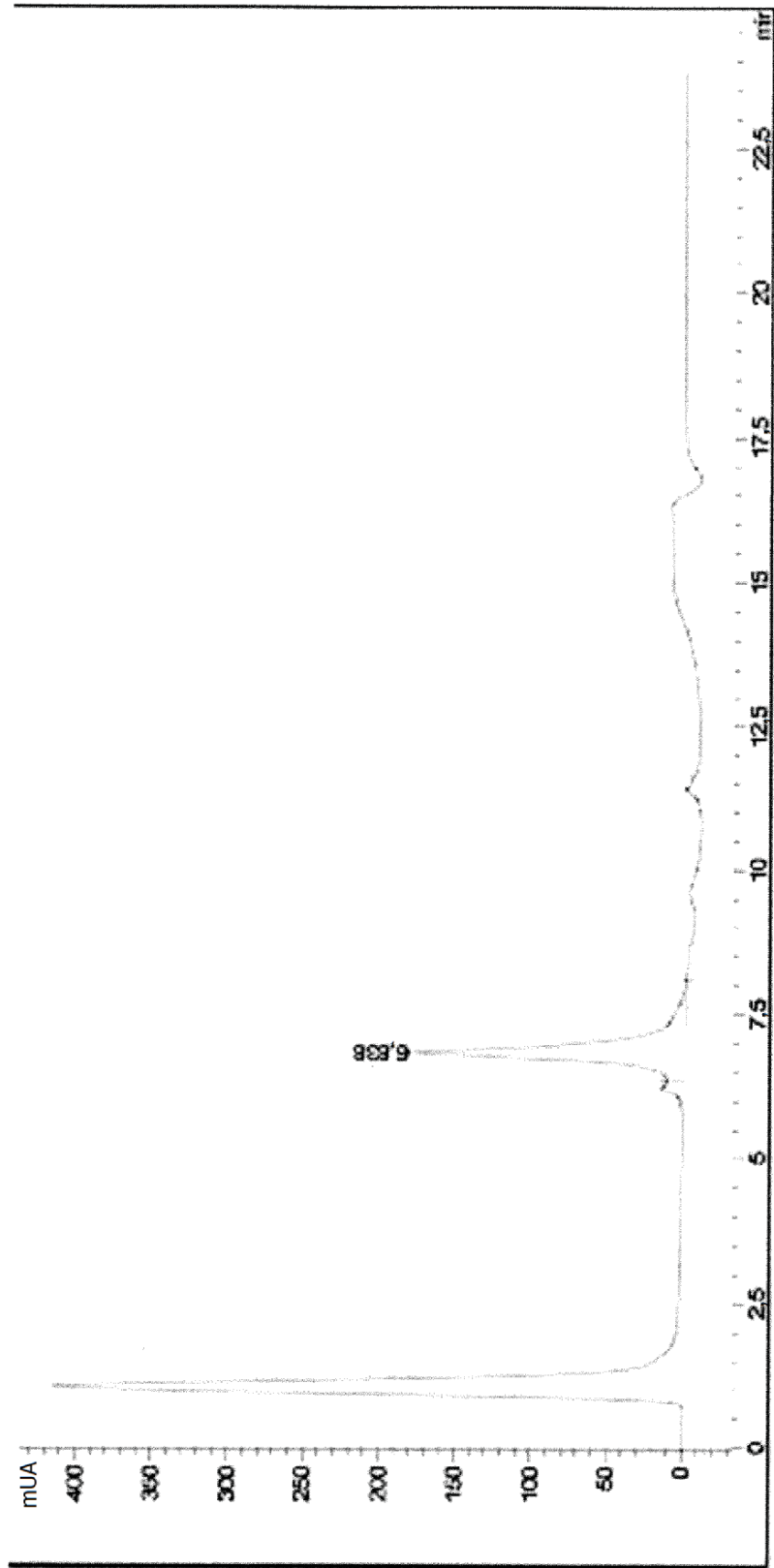


Figura 3

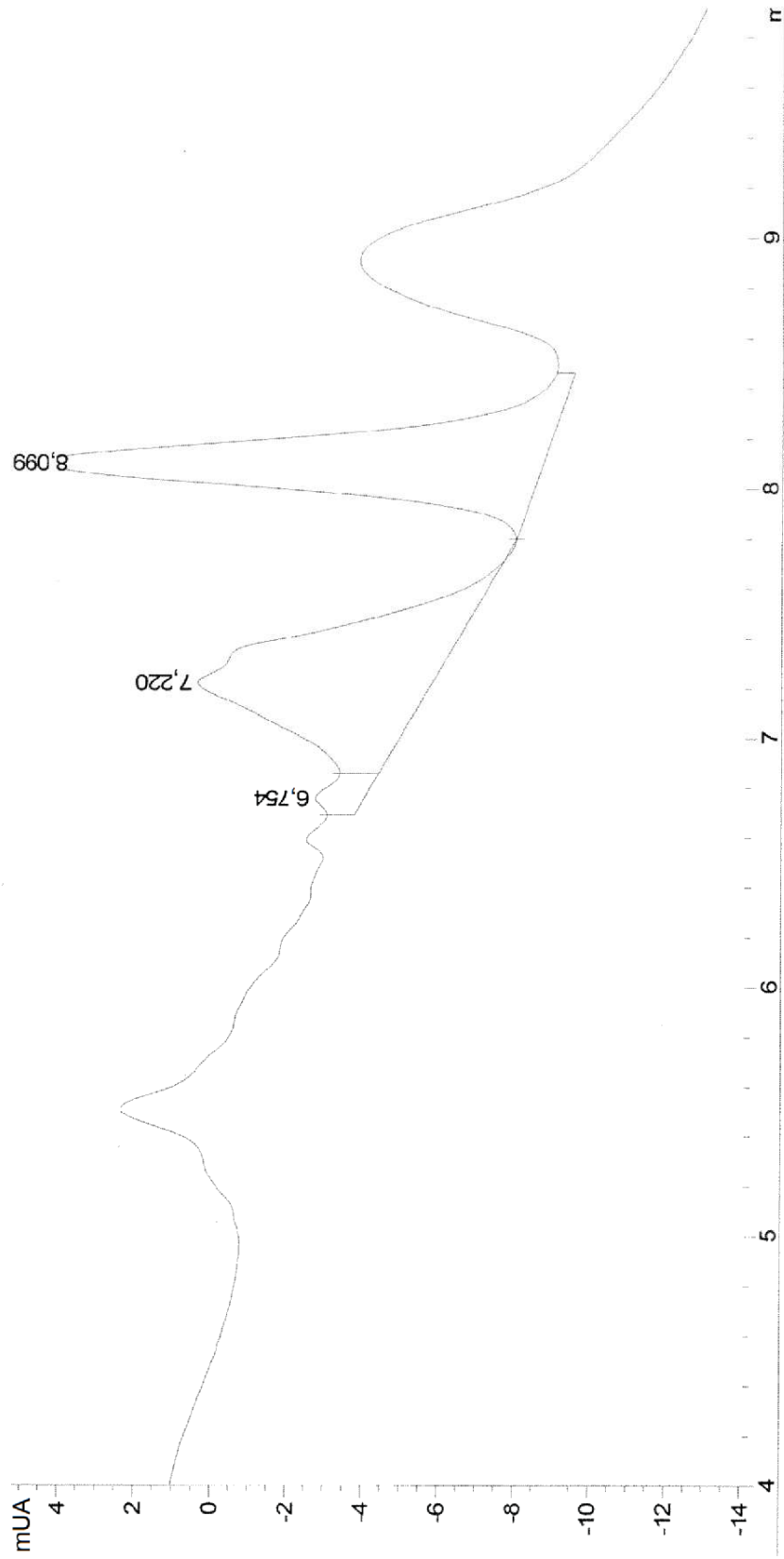


Figura 4

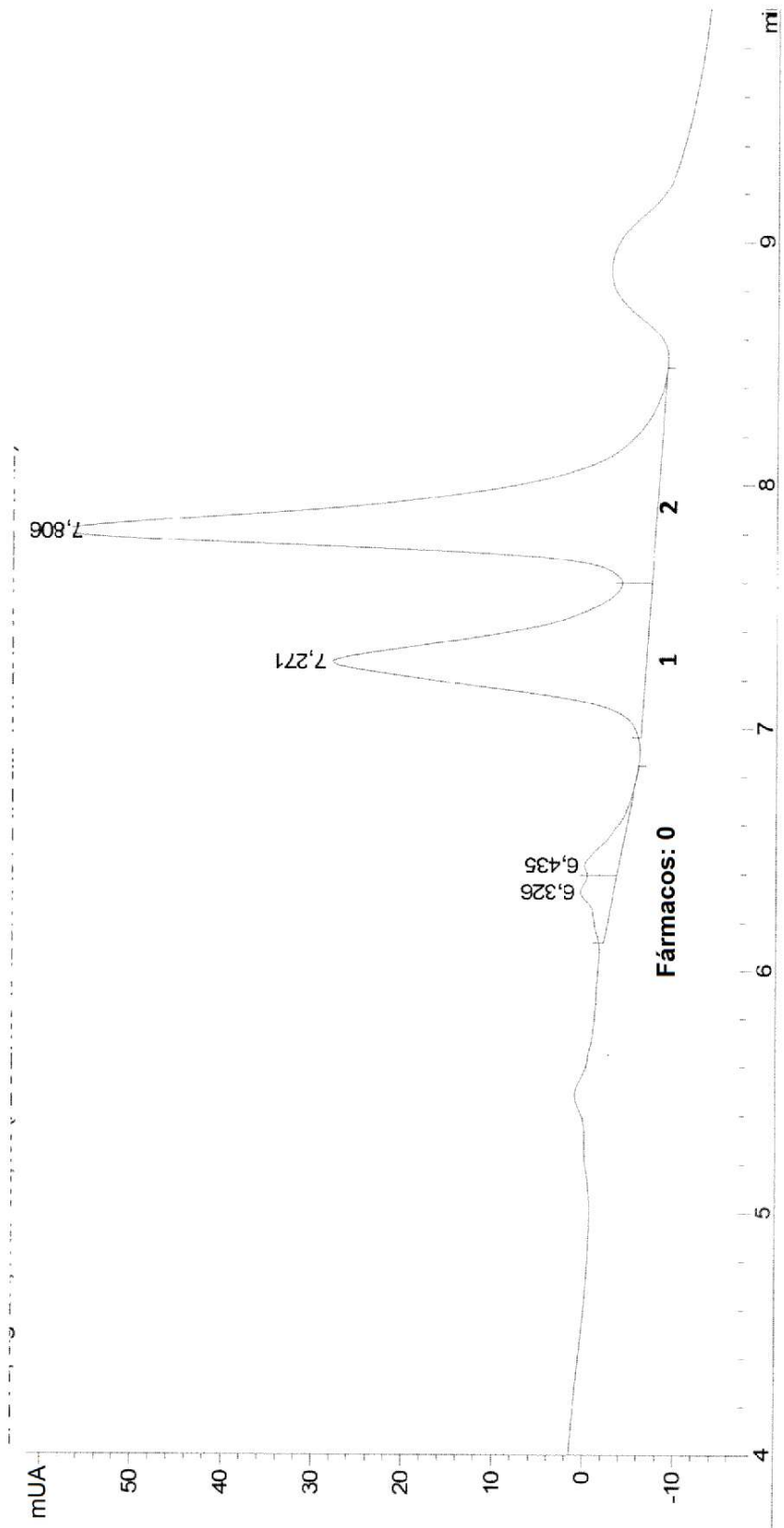


Figura 5A

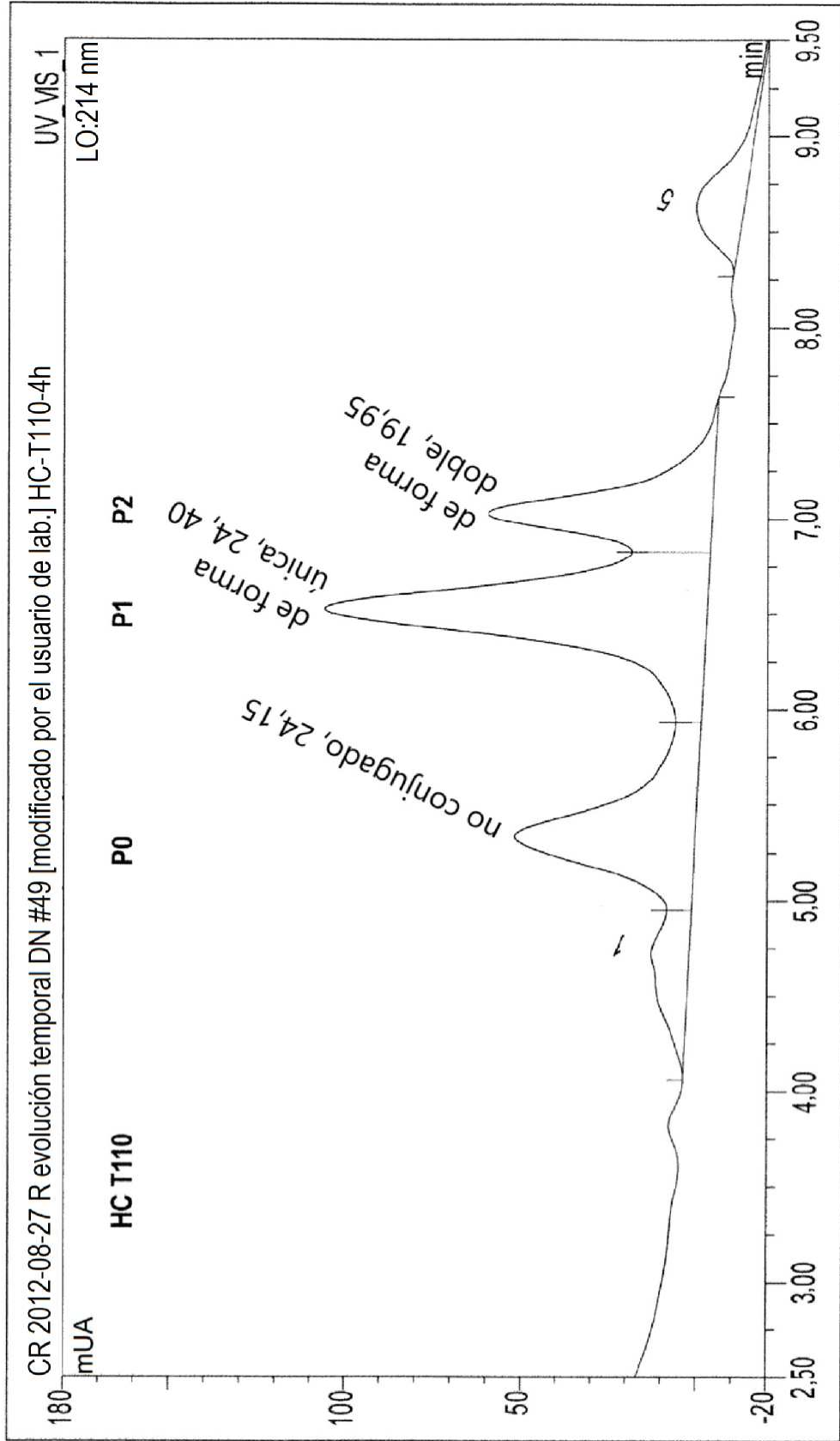


Figura 5B

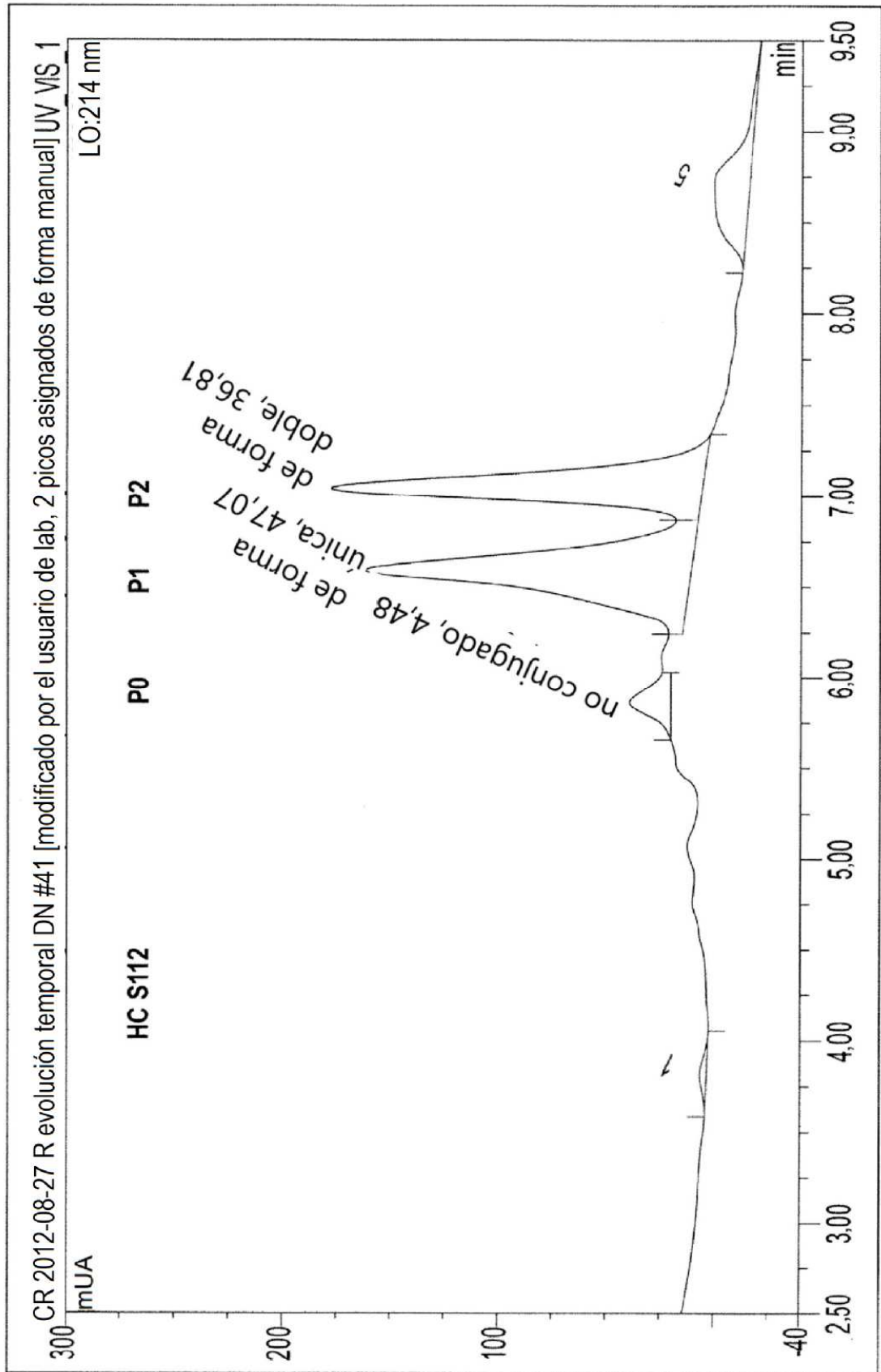
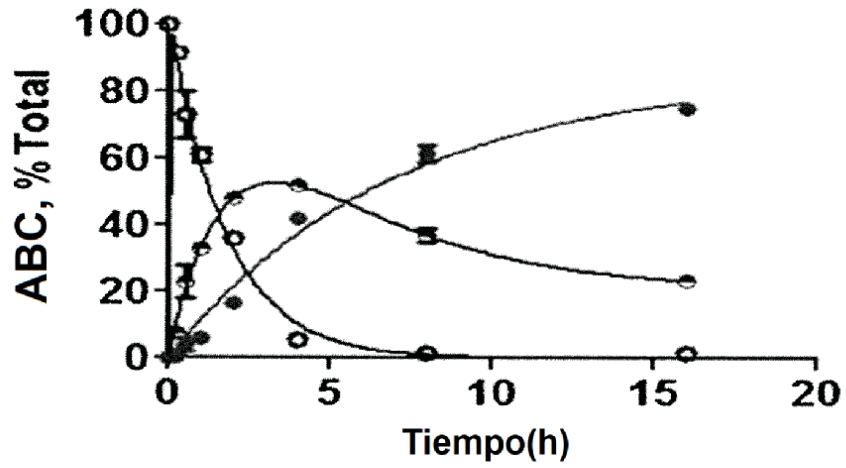


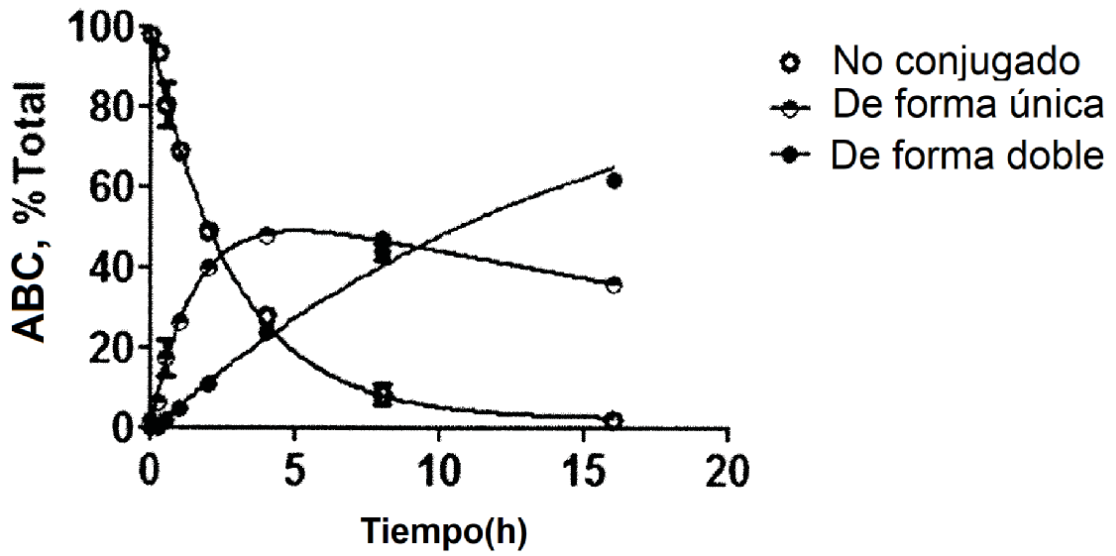
Figura 6

HC S112

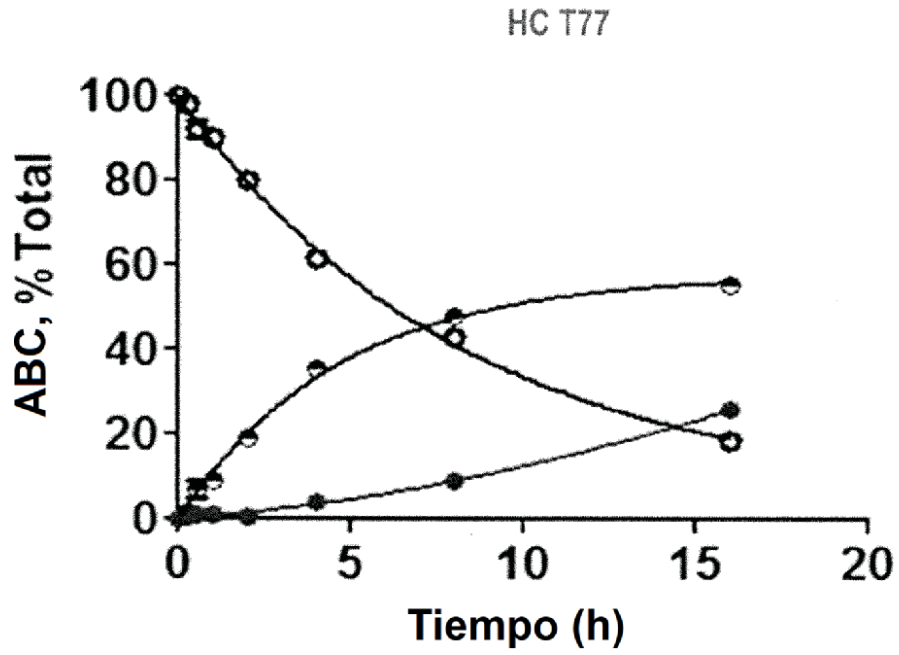


6A

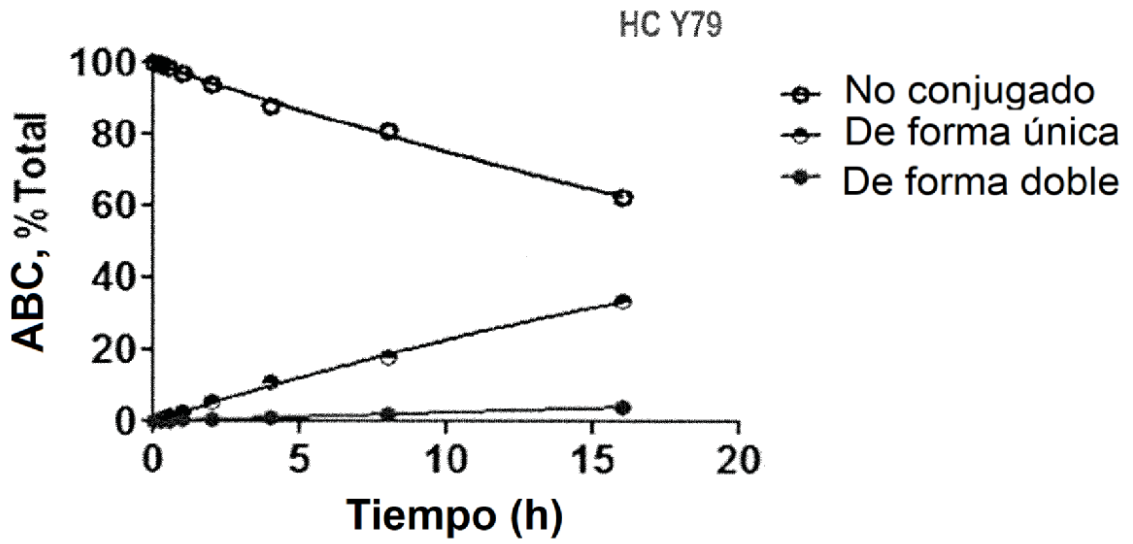
HC T110



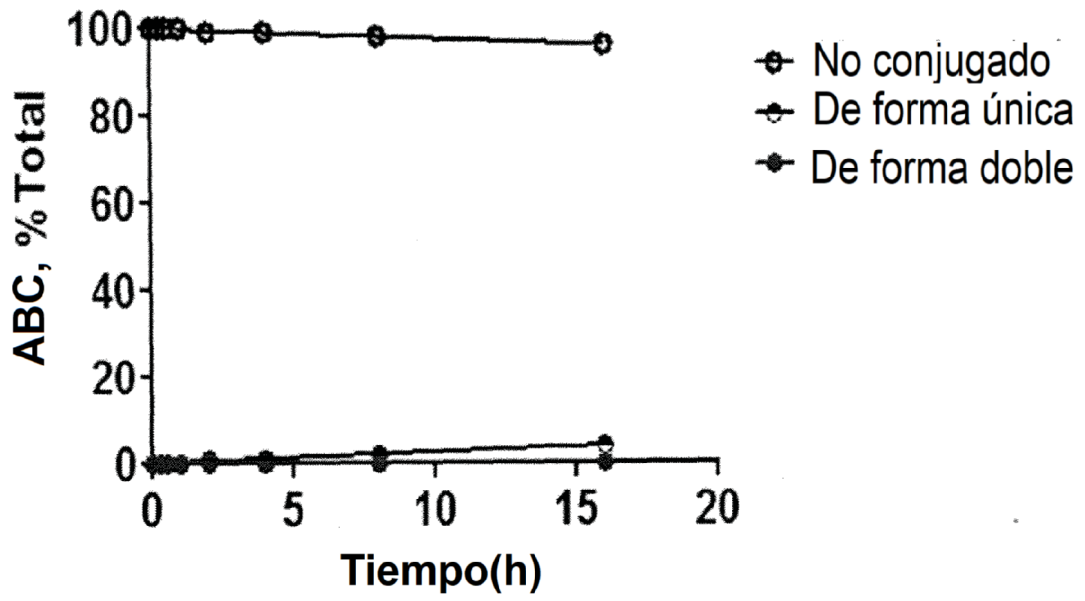
6B



6C



6D



6E

Figura 7A

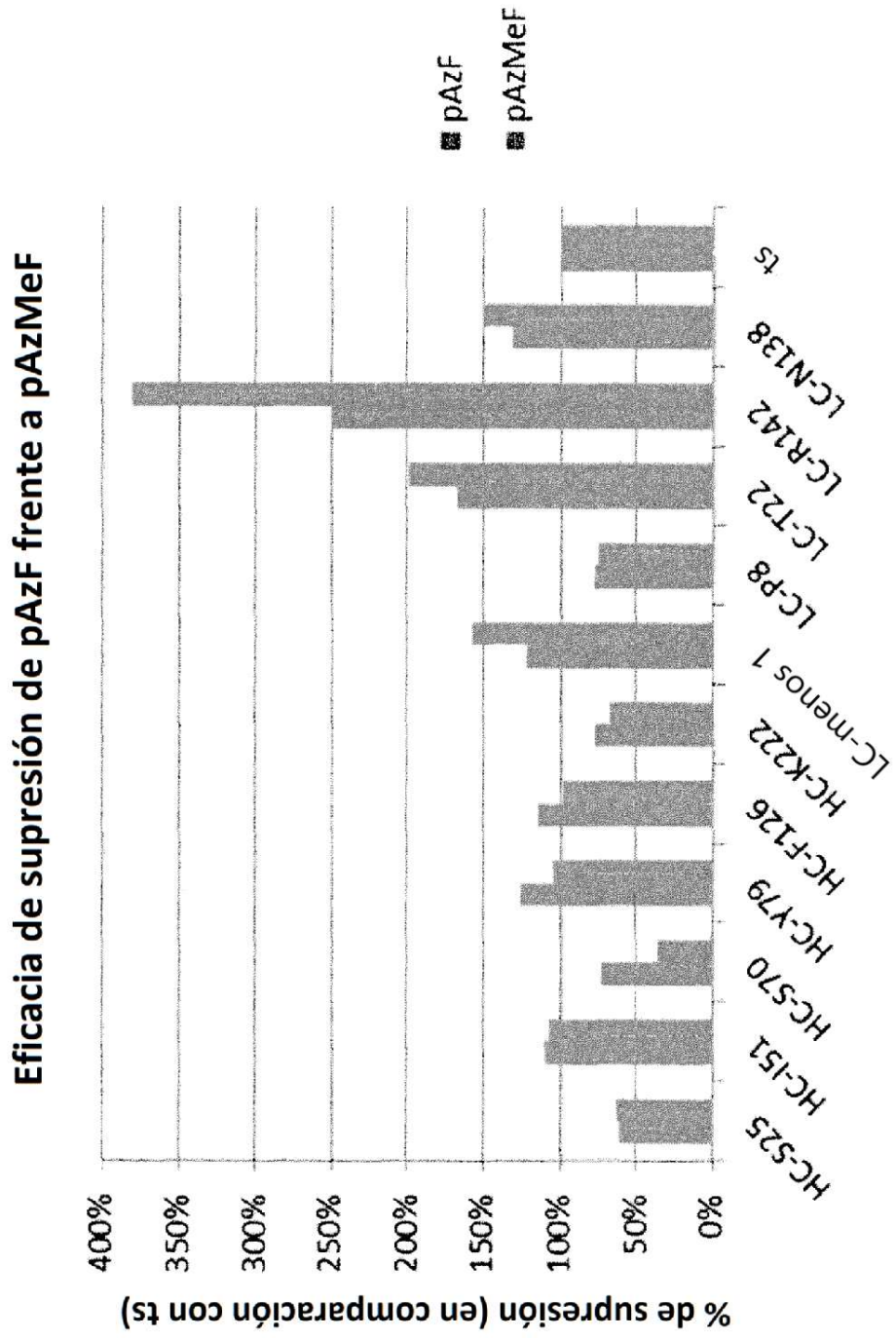


Figura 7B

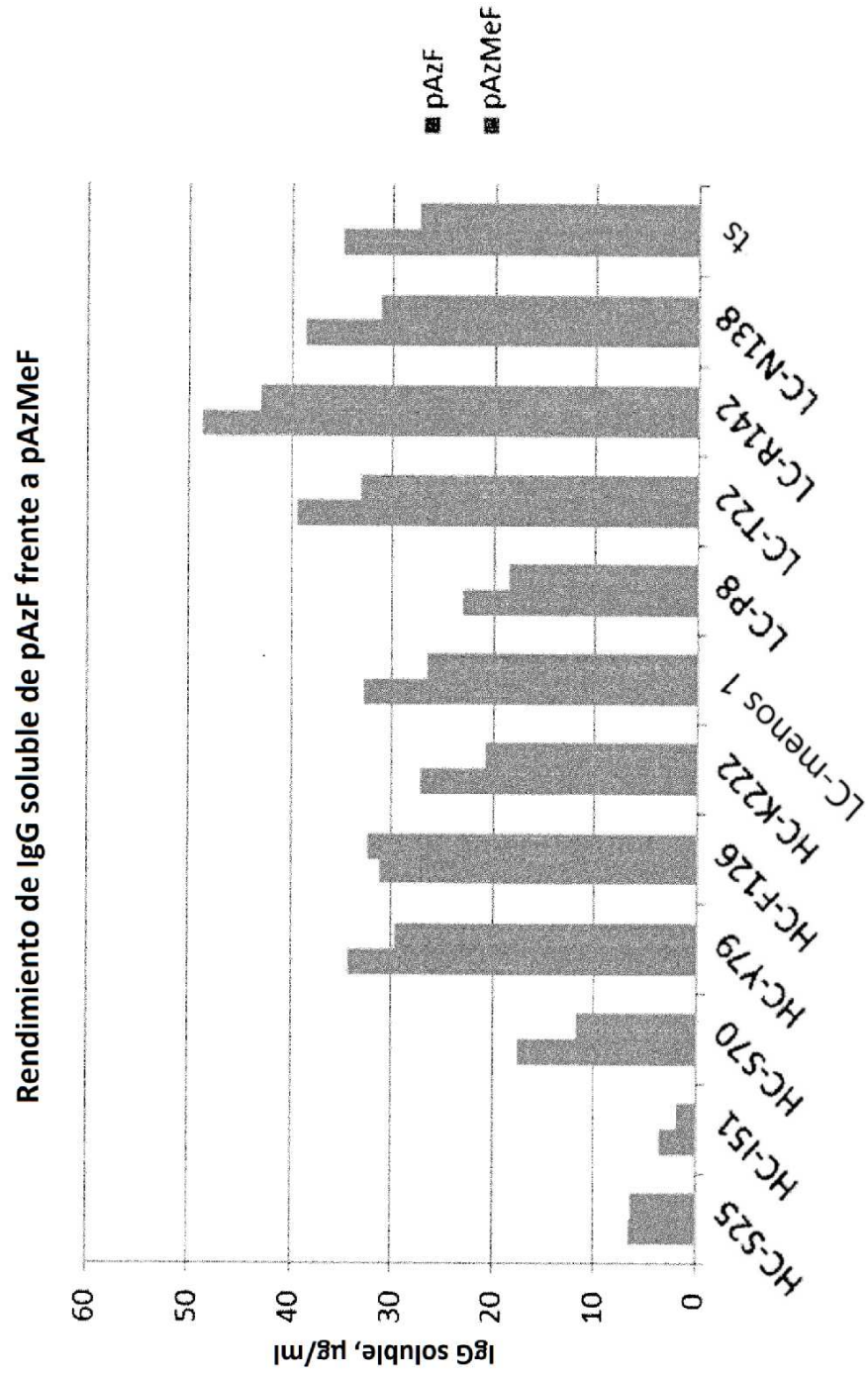


Figura 8

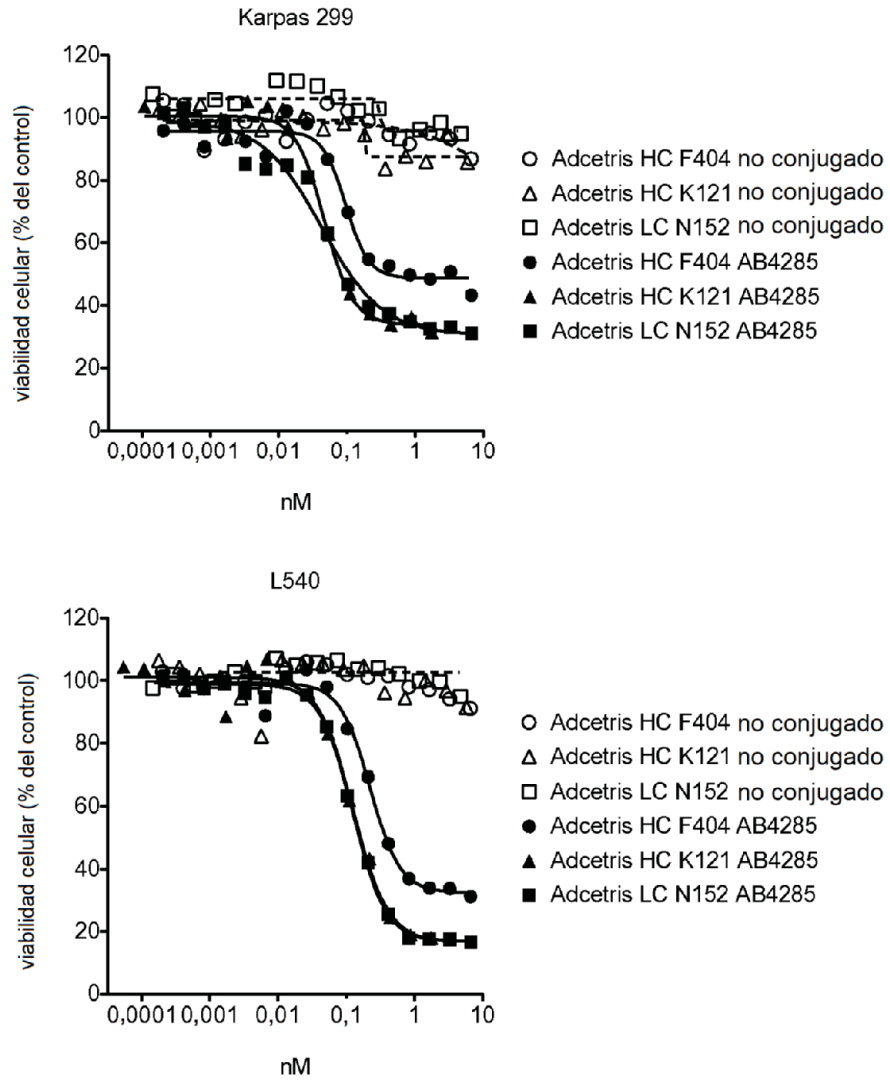


Figura 9

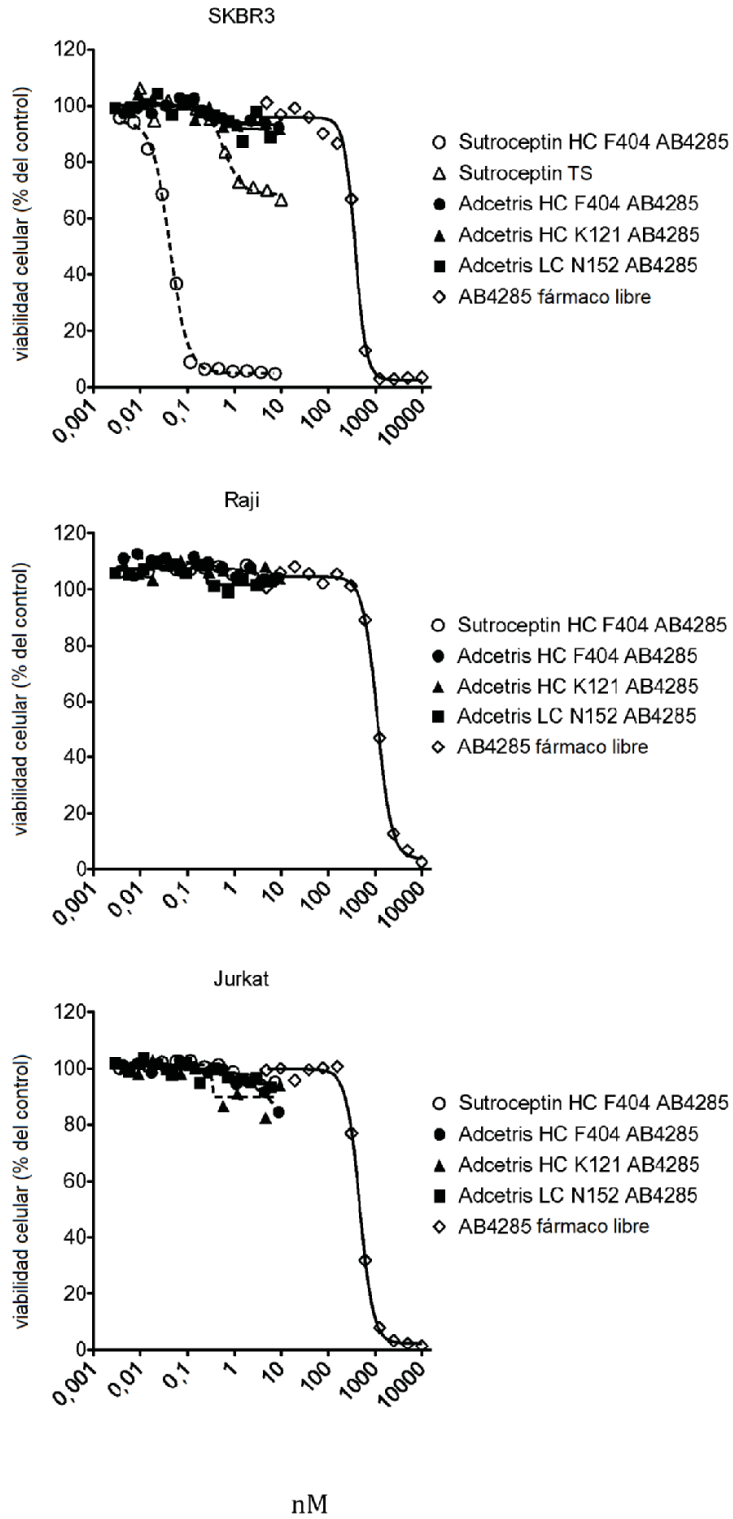


Figura 10

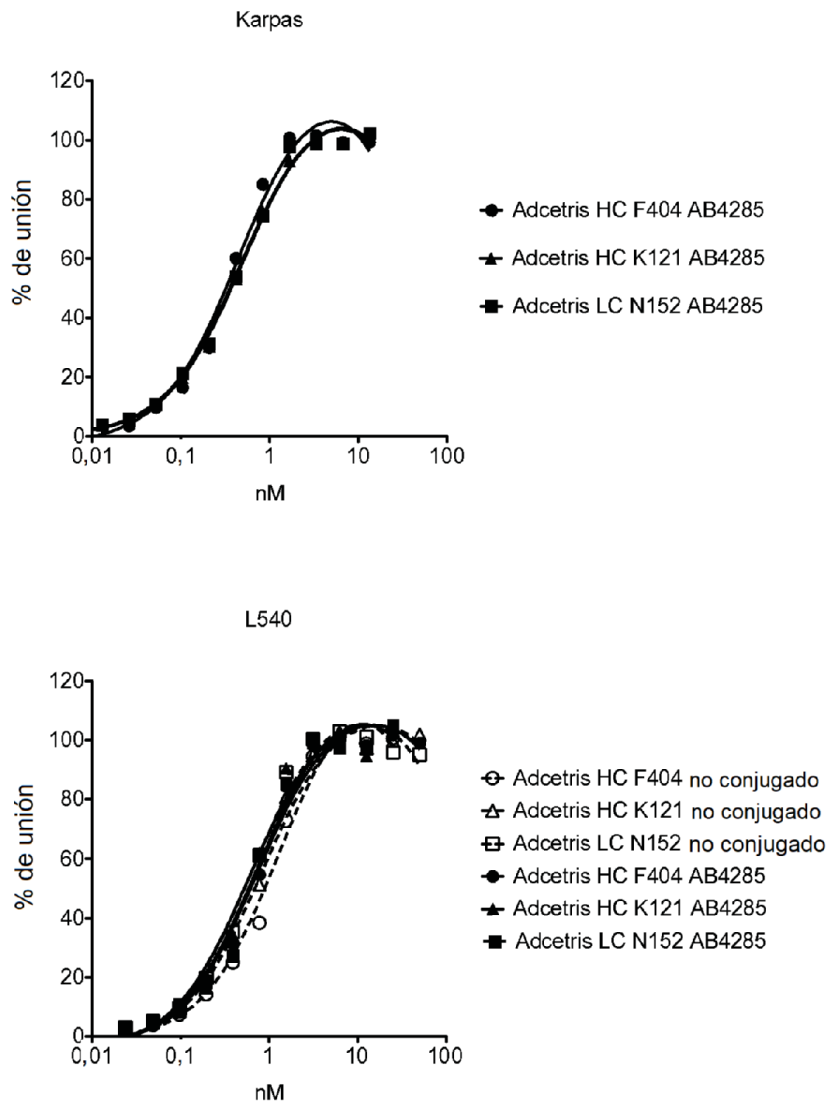


Figura 11

Figura 11A: DBCO-MMAF 2

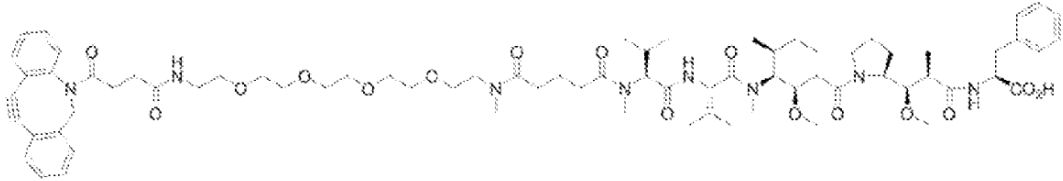


Figura 11B: DBCO-DM4

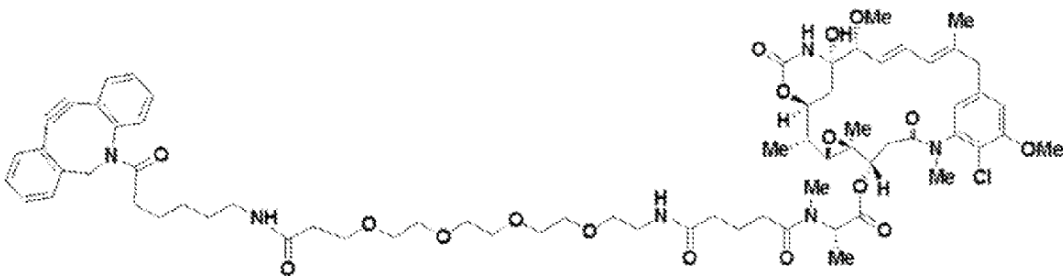


Figura 11C: DBCO-DM4 2

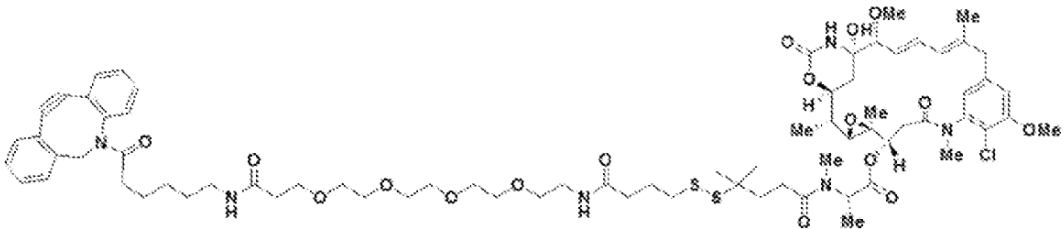


Figura 11D: DBCO-MMAE

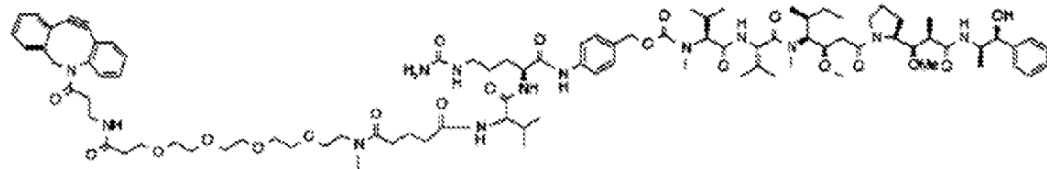


Figura 12

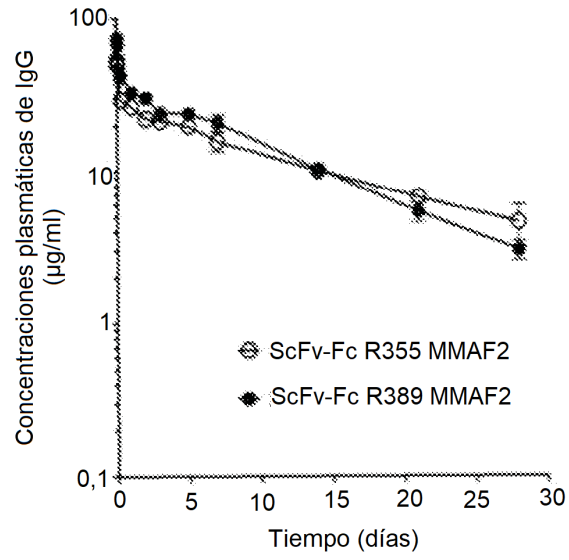


Figura 13a

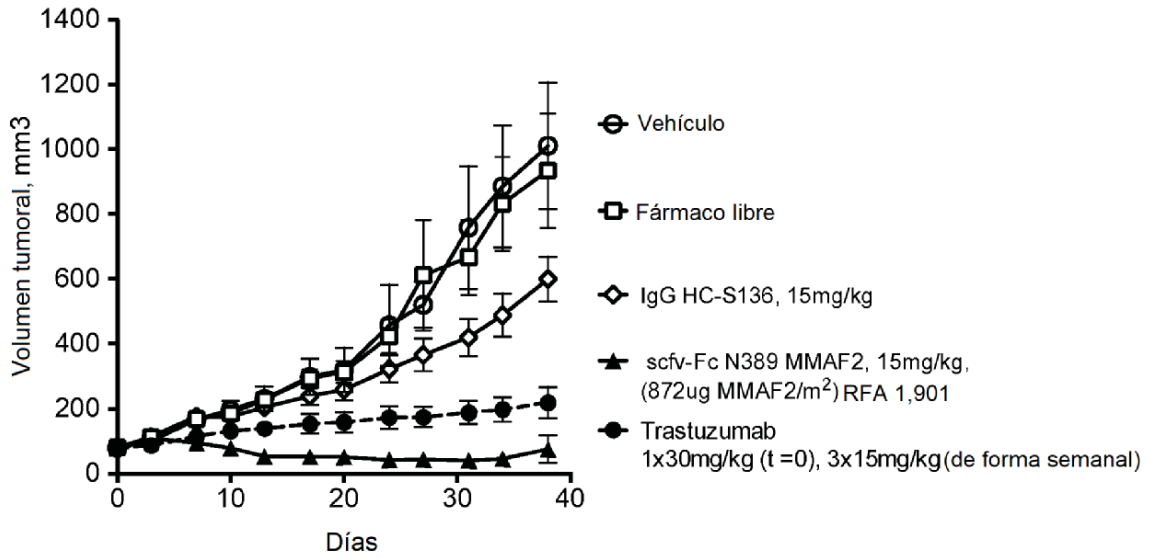


Figura 13b

