

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 329**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13185117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13732008 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2858676**

54 Título: **Conjugados de fármaco de anticuerpos de antígeno de membrana específico a la próstata**

30 Prioridad:

07.06.2012 US 201261656883 P

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

23.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARNETT, RICHARD S.;
TIAN, FENG;
PUTNAM, ANNA-MARIA A. HAYS;
GYMNOPOULOS, MARCO;
KNUDSEN, NICK;
BECK, ANDREW y
SUN, YING**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 725 329 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

Conjugados de fármaco de anticuerpos de antígeno de membrana específico a la próstata

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a conjugados de fármaco de anticuerpos de antígeno de membrana específico a la próstata (PSMA) que comprenden al menos un aminoácido codificado no natural.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El cáncer de próstata es el tumor maligno no relacionado con la piel más comúnmente diagnosticado en los hombres en los países desarrollados. Se estima que uno de cada seis hombres será diagnosticado con cáncer de próstata. El diagnóstico de cáncer de próstata ha mejorado mucho después del uso de marcadores a base de suero, como el antígeno prostático específico (PSA). Además, los antígenos asociados a tumores de próstata ofrecen objetivos para la obtención de imágenes de tumores, el diagnóstico y las terapias dirigidas. El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), un marcador asociado al tumor de la próstata, es un objetivo de este tipo.

[0003] El PSMA es una glicoproteína altamente restringida a membranas de células epiteliales secretoras de próstata. Su nivel de expresión se ha correlacionado con la agresividad del tumor. Varios estudios inmunohistológicos han demostrado niveles elevados de PSMA en prácticamente todos los casos de carcinoma de próstata en comparación con los niveles en células epiteliales de próstata benignas. La tinción intensa con PSMA se encuentra en todas las etapas de la enfermedad, incluida la neoplasia intraepitelial prostática, el cáncer de próstata independiente de andrógenos en etapa tardía y los tumores de próstata secundarios localizados en los ganglios linfáticos, huesos, tejidos blandos y pulmones.

[0004] El PSMA forma un homodímero no covalente que posee actividad glutamato carboxipeptidasa basándose en su capacidad para procesar el neuropéptido N-acetilaspargilglutamato y derivados de folato conjugado con glutamato. Aunque el papel biológico preciso que desempeña el PSMA en la patogenia de la enfermedad sigue siendo desconocido, su sobreexpresión en los tumores de próstata es bien conocida. Se ha sugerido que PSMA realiza múltiples funciones fisiológicas relacionadas con la supervivencia y migración celular.

[0005] Las terapias basadas en anticuerpos han surgido como componentes importantes de terapias para un número creciente de tumores malignos humanos en campos tales como oncología, enfermedades inflamatorias e infecciosas. En la mayoría de los casos, la base de la función terapéutica es el alto grado de especificidad y afinidad que tiene el fármaco basado en anticuerpos para su antígeno diana. Armar los anticuerpos monoclonales con drogas, toxinas o radionúclidos es otra estrategia por la cual los mAbs pueden inducir un efecto terapéutico. Al combinar la exquisita especificidad de direccionamiento del anticuerpo con el poder de destrucción tumoral de las moléculas efectoras tóxicas, los inmunocombinados permiten una discriminación sensible entre el tejido diana y el tejido normal, lo que produce menos efectos secundarios que la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos convencionales.

[0006] Teniendo en cuenta las propiedades físicas de PSMA y su patrón de expresión en relación con la progresión del cáncer de próstata PSMA es un excelente objetivo en el desarrollo de conjugados anticuerpo-fármaco para formación de imágenes, de diagnóstico y usos terapéuticos. El primer MAb específico para PSMA informado, 7E11, se desarrolló y comercializó posteriormente como un agente de diagnóstico para imágenes de tumores (ProstaScint, Cytogen, Princeton, NJ). Sin embargo, este anticuerpo reconoce un epítipo intracelular de PSMA que limita su utilidad como agente de formación de imágenes para la detección de PSMA. Más recientemente, se identificaron MABs como J591 que reconocen la porción extracelular de PSMA. Por lo tanto, se necesitan conjugados de anticuerpo-fármaco anti-PSMA que pueden utilizarse para imágenes, diagnósticos y/o usos terapéuticos. La presente invención proporciona dichos conjugados anticuerpo-fármaco para uso en cáncer de próstata.

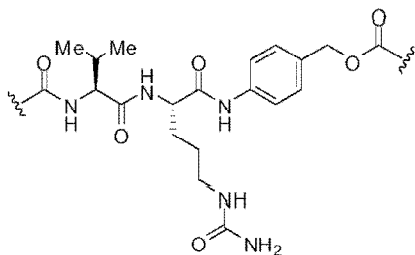
55 RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] En el presente documento se describen anticuerpos de PSMA unidos a restos tóxicos a través de uno o más aminoácidos no naturales con uno o más enlaces, y métodos para preparar tales aminoácidos y polipéptidos no naturales.

[0008] La presente invención proporciona un compuesto que comprende la Fórmula (VIII) o (IX) en el que el compuesto es un anticuerpo de antígeno de membrana específico anti-próstata (α PSMA) conjugado a un dolastatina, en el que la conjugación tiene lugar a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde las fórmulas (VIII) y (IX) corresponden a:

65

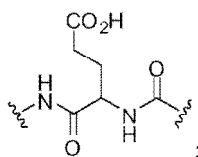
5



10

U tiene la estructura de:

15



20

25

y cada N, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno; en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;

en donde alquileo inferior significa un grupo alquileo con ocho o menos átomos de carbono; o solvato de los mismos.

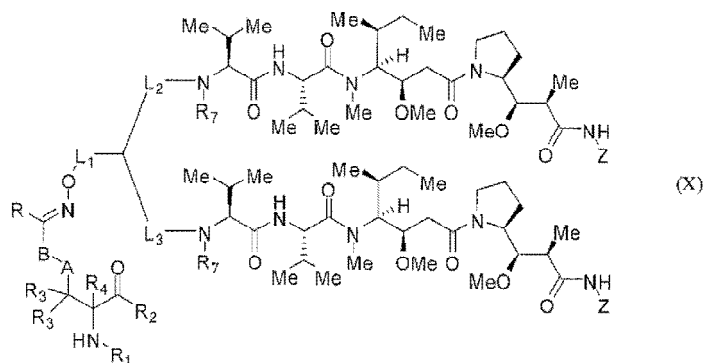
30

[0009] En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es un anticuerpo de antígeno de membrana específica de la próstata. En algunas realizaciones, el anticuerpo es α-PSMA. En otras realizaciones, R₂ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo α-PSMA. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es ARX-αPSMA (SEQ. ID. NO.: 1).

35

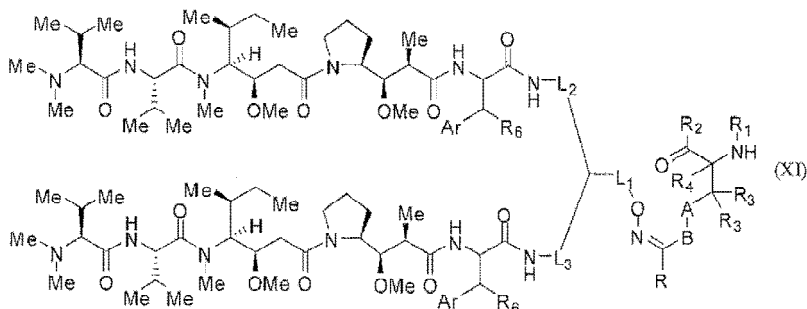
[0010] La presente invención también proporciona un compuesto, o sal del mismo, que comprende la fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), en el que el compuesto es un anticuerpo de antígeno de membrana específica anti-próstata (αPSMA) conjugado a una dolastatina, en donde se produce la conjugación via un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) corresponde a:

40



50

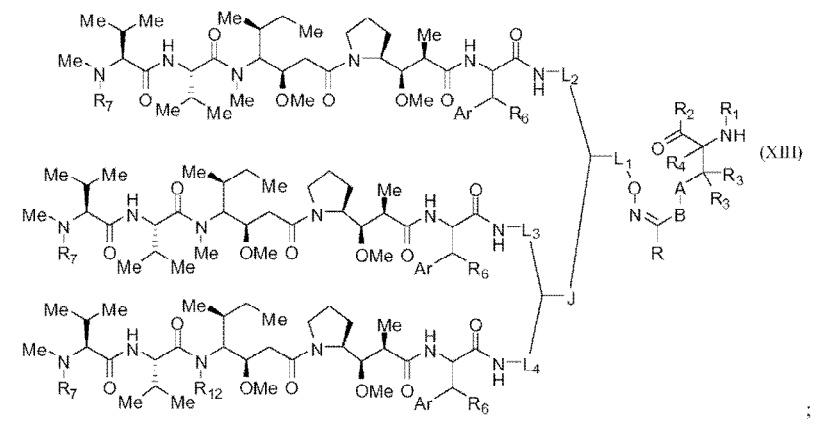
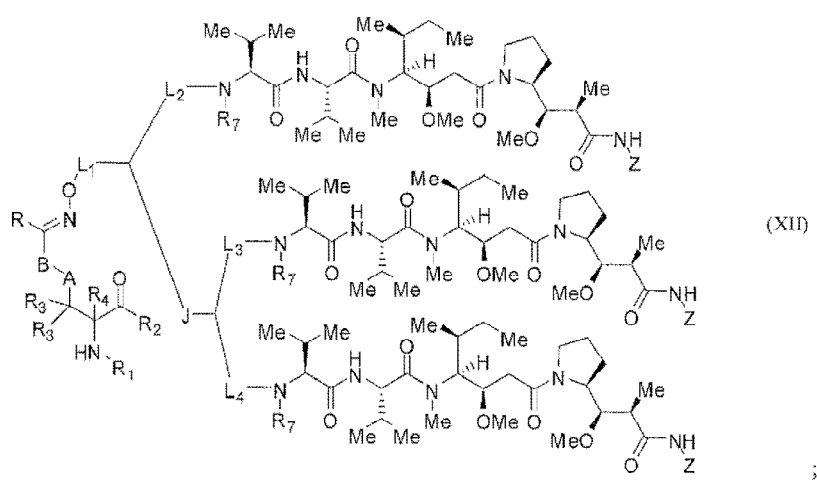
55



60

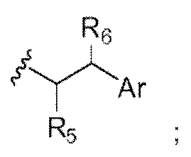
65

5
10
15
20
25
30
35



en donde:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heterarileno, 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)-, -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-, 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 y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;
 en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;
 R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;
 Z tiene la estructura de:

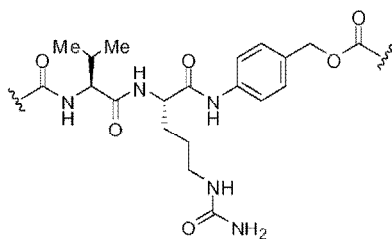


65

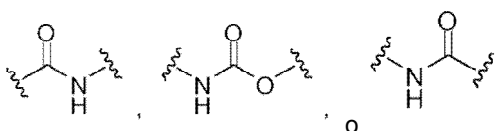
R⁵ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆, o tiazol;
 R⁶ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

5 R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 L₁, L₂, L₃ y L₄ son, cada uno, enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un
 enlace, alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -J-(alquileo-O)_n-
 10 alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J'-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo'-, -W-, -
 alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-
 alquileo'-NMe-alquileo"-W-, y alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

W tiene la estructura de:



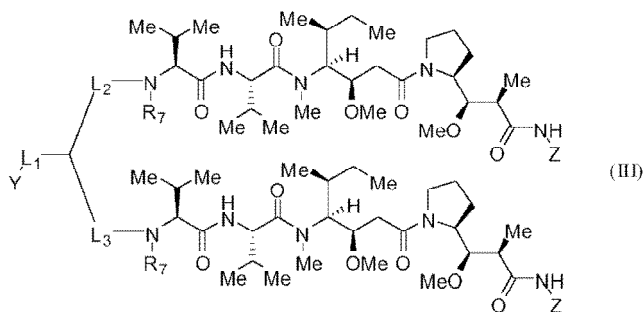
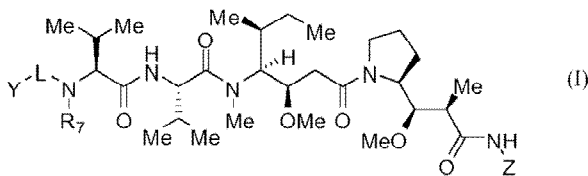
25 cada J y J' independientemente tienen la estructura de:



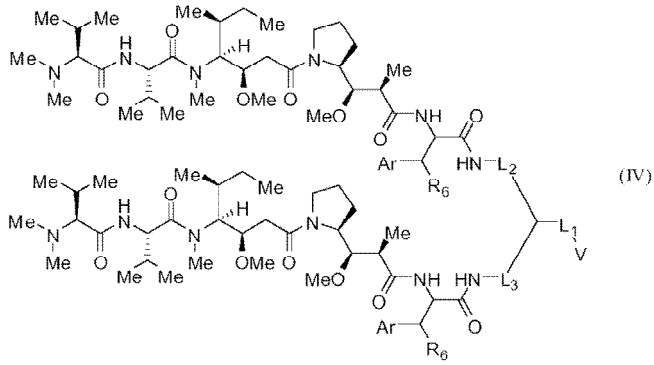
y
 cada n y n' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;
 en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;
 en donde alquileo inferior significa un grupo alquileo con ocho o menos átomos de carbono.

40 **[0011]** En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es herceptina. En otras realizaciones, R₂ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es αPSMA. En algunas realizaciones, el anticuerpo se deriva de cualquier anticuerpo αPSMA conocido. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es ARX-αPSMA.

45 **[0012]** La invención también proporciona un método para la derivatización de un análogo de dolastatina comprende la Fórmula (I), (III), (IV), (V) o (VI), en el que el análogo de dolastatina derivatizado es un anticuerpo αPSMA conjugado a una dolastatina, en donde la conjunción se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, el método comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de Fórmula (XXXVII), en donde Fórmula (I), (III), (IV), (V), o (VI) corresponden a:



5



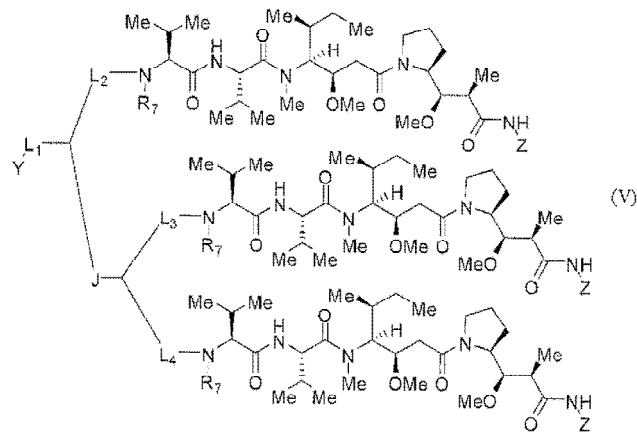
10

15

20

25

30

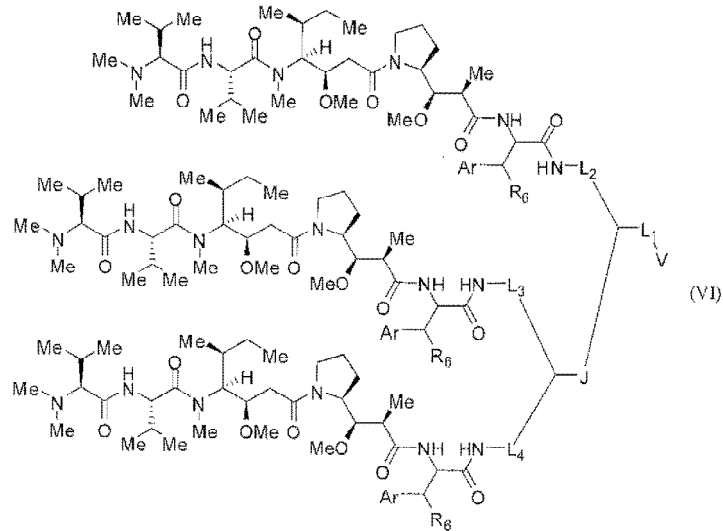


35

40

45

50



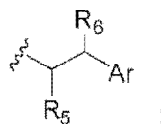
55

en donde:

60

Z tiene la estructura de:

65



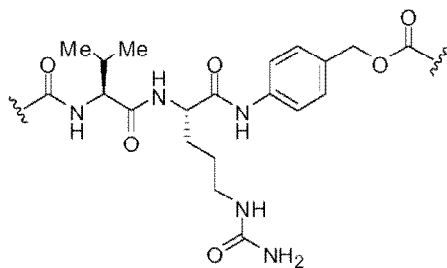
R₅ es H, COR o C alquilo C₁-C₆, o tiazol;
 R⁸ es OH o -NH-(alquilenno-O)_n-NH₂;

R₆ es OH o H;

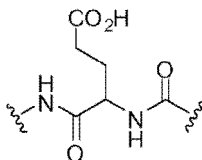
Ar es fenilo o piridina;
 R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y y V son NH₂-O-;

L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquilenno, alquilenno-C(O)-, -(alquilenno-O)_n- alquilenno, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-C(O)-, -(alquilenno-O)_n- (CH₂)_n-NHC(O)- (CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquilenno-O)_n-alquilenno-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-W-, -alquilenno-C(O)-W-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-J-, alquilenno'-J-(alquilenno-O)_n- alquilenno-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-J-alquilenno', -J-(alquilenno-O)_n-alquilenno-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-J-(alquilenno-O)_n-alquilenno-J'-, -W-, -alquilenno-W-, alquilenno'-J-(alquilenno-NMe)_n-alquilenno-W-, y J-(alquilenno-NMe)_n-alquilenno-W-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-U-alquilenno-C(O)-, -(alquilenno-O)_n-alquilenno-U-alquilenno-; -J-alquilenno-NMe-alquilenno'-NMe-alquilenno"-W-, y -alquilenno-J-alquilenno'-NMe-alquilenno"-NMe-alquilenno"-W-;

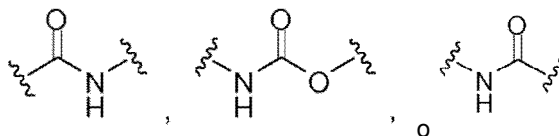
W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:

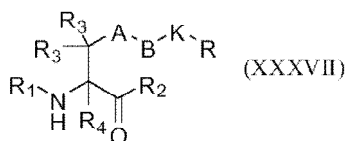


cada J y J' independientemente tienen la estructura de:



o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈, y R₈ es -NH-(alquilenno-O)_n-NH₂; y cada n, n', n", n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno; en donde Formula (XXXVII) corresponde a:

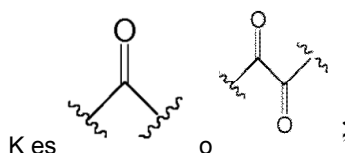
en donde:



A es opcional, y cuando está presente es alquilenno inferior, alquilenno inferior sustituido, alquilenno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenno o aralquilenno sustituido;
 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenno inferior,

alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo 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;

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



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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

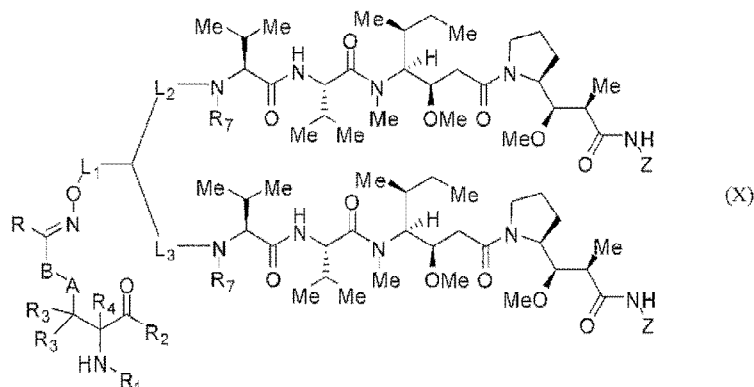
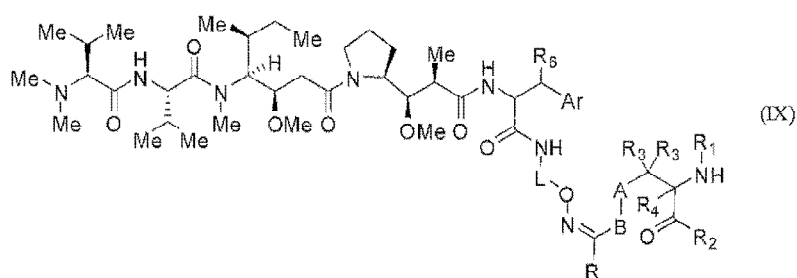
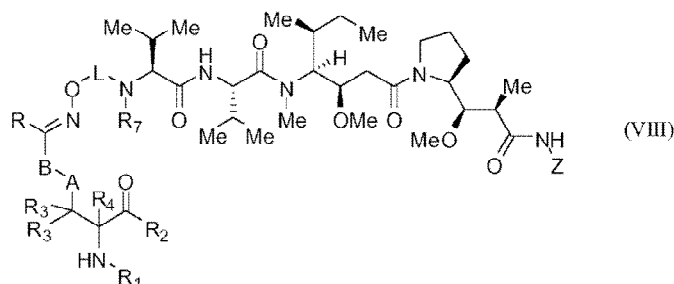
en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; y

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

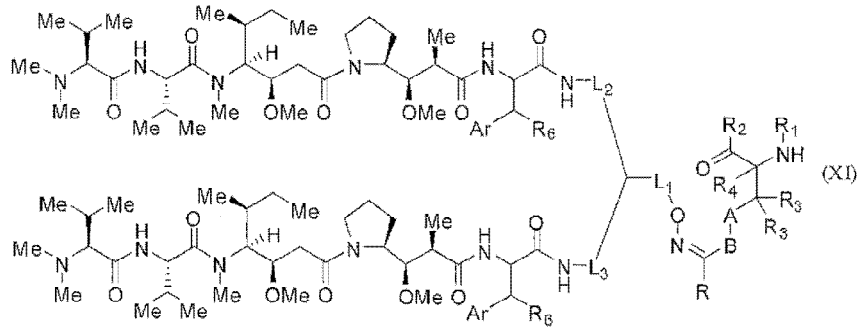
en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;

en donde alquilenilo inferior significa un grupo alquilenilo con ocho o menos átomos de carbono.

[0013] En algunas realizaciones, el análogo de dolastatina derivatizado comprende al menos una oxima que contiene aminoácido que tiene la estructura de Fórmula (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), o (XIII):



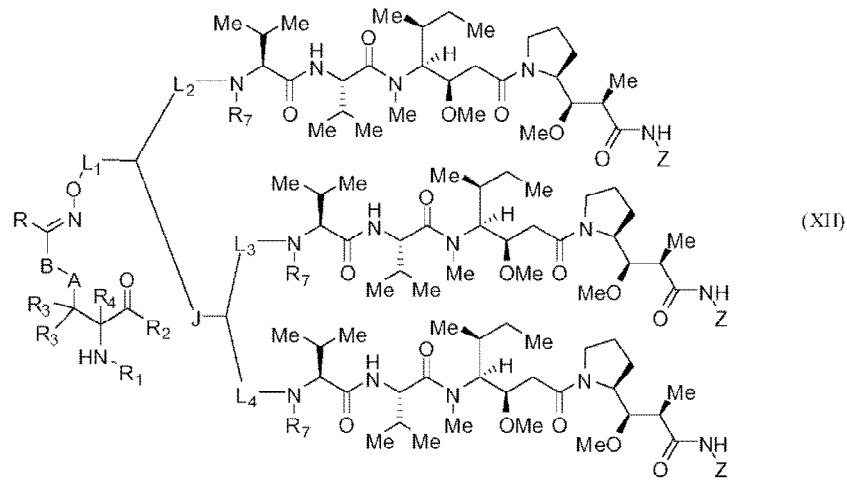
5



10

15

20

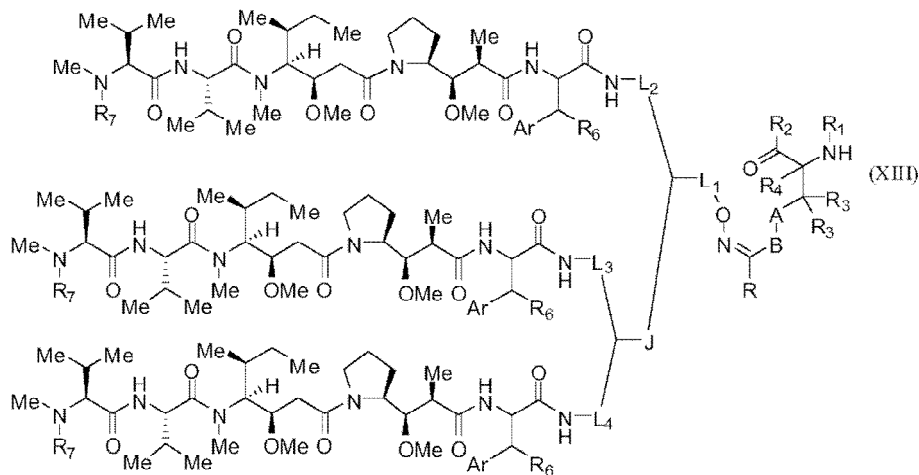


25

30

35

40



45

50

55 **[0014]** En realizaciones específicas, el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de fórmula (XXXVII) en una solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas.

60 **[0015]** En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos descritos y un vehículo, excipiente o aglutinante farmacéuticamente aceptable.

65 **[0016]** En realizaciones adicionales o alternativas se encuentran métodos para detectar la presencia de un polipéptido en un paciente, comprendiendo el método la administración de un polipéptido que comprende al menos un aminoácido no natural que contiene un heterociclo y el aminoácido no natural que contiene el heterociclo resultante. El polipéptido modula la inmunogenicidad del polipéptido con respecto al polipéptido de aminoácido de origen natural homólogo.

[0017] Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 **[0018]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenecen las invenciones descritas en el presente documento. Aunque cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o prueba de las invenciones que se describen en el presente documento, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora.

10 **[0019]** Los términos "enlace basado en aldol" o "enlace basado en aldol mezclado" se refiere a la condensación catalizada por ácido o base de un compuesto carbonilo con el enolato/enol de otro compuesto de carbonilo, que puede o no puede ser lo mismo, para generar un compuesto β -hidroxi carbonilo-un aldol.

15 **[0020]** El término "etiqueta de afinidad", como se usa aquí, se refiere a una etiqueta que se une reversiblemente o irreversiblemente otra molécula, ya sea para modificarla, destruirla, o formar un compuesto con ella. A modo de ejemplo, las etiquetas de afinidades incluyen enzimas y sus sustratos, o anticuerpos y sus antígenos.

20 **[0021]** Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquilitio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo con enlaces a las moléculas a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

25 **[0022]** El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otra molécula significa, a menos se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designados (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, p. ej., n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle en el presente documento, tales como "heteroalquilo", "haloalquilo" y "homoalquilo".

35 **[0023]** El término "alquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, por $(-\text{CH}_2)_n$, en donde n puede ser de 1 a aproximadamente 24. A modo de ejemplo solamente, tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono, tales como las estructuras $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono. El término "alquileno", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir los grupos descritos en el presente documento como "heteroalquileno".

45 **[0024]** El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos naturales y no naturales, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, solo a modo de ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo de aminoácidos y un grupo R. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos peptídicos modificados mientras aún conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los ejemplos no limitativos de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilo sulfonio.

55 **[0025]** Se puede hacer referencia a los aminoácidos en este documento ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidas o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Además, los nucleótidos pueden ser referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

60 **[0026]** Un "grupo de modificación amino terminal" se refiere a cualquier molécula que puede ser unido a un grupo amina terminal. A modo de ejemplo, dichos grupos amino terminales pueden estar en el extremo de las moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. Solo a modo de ejemplo, los grupos de modificación terminal incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Los grupos de modificación terminal se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, que incluyen, entre otros, el aumento de la semivida sérica de los péptidos.

65

[0027] Por "anticuerpo" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la totalidad o parte de los genes del anticuerpo. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. El anticuerpo en este documento pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, e incluye anticuerpos que existen naturalmente en cualquier organismo o están diseñados (p. ej., son variantes).

[0028] El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos, anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos suelen estar formados por dos cadenas ligeras y dos pesadas que comprenden regiones variables y regiones constantes. La región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones marco. La región variable de la cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones marco.

[0029] Anticuerpos antígeno de membrana específicos a la próstata Ti (α PSMA) conocidos en la técnica son adecuados para uso en la presente invención. P. ej., las secuencias para el anticuerpo α PSMA J591 se dan en los EE.UU.

[0030] Patente N^o. 7.666.425; anticuerpos α PSMA y los fragmentos de unión a antígeno se dan en la Patente de los Estados Unidos N^o. 8.114.965. Otras patentes de EE.UU. que describen secuencias de anticuerpos de α PSMA y/o agentes de unión a PSMA incluyen la Patente de Estados Unidos N^o 7.875.278; Patente de Estados Unidos N^o 7.850.971; Patente de Estados Unidos N^o 7.514.078; Patente de Estados Unidos N^o. 7.476.513; Patente de Estados Unidos N^o 7.381.407; Patente de Estados Unidos N^o 7.201.900; Patente de Estados Unidos N^o 7.192.586; Patente de EE.UU. n^o 7.045.605; Patente de Estados Unidos N^o 6.962.981; Patente de Estados Unidos N^o 6.387.888; y la Patente de EE.UU. n^o 6.150.508.

[0031] El término "fragmento de unión a antígeno", como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V.sub.L, la V.sub.H, la C.sub.L y C.sub.H1; (ii) un fragmento F(ab').sub.2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V.sub.H y C.sub.H1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V.sub.L y V.sub.H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V.sub.H; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR), p. ej., V.sub.H CDR3 que comprende o no una secuencia adicional (enlazador, región(es) de marco(s), etc.) y (v) una combinación de dos a seis CDR aisladas que comprende o no secuencia adicional (enlazador, región(s) de marco, etc.). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V.sub.L y V.sub.H, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite hacerse como una sola cadena polipeptídica en donde las regiones V.sub.L y V.sub.H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, p. ej., Bird et al. (1988) Science 242: 423-426 y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también pretenden incluirse dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada fusionada a una región variable de cadena ligera a través de un péptido enlazador) que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. La región bisagra puede modificarse reemplazando uno o más residuos de cisteína con residuos de serina para evitar la dimerización. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[0032] Un sitio de unión al antígeno típico se compone de las regiones variable formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una cadena pesada de inmunoglobulina. La estructura de las regiones variables del anticuerpo es muy consistente y exhibe estructuras muy similares. Estas regiones variables están compuestas típicamente por regiones marco relativamente homólogas (FR) interpuestas con tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). La actividad de unión global del fragmento de unión a antígeno a menudo está dictada por la secuencia de las CDR. Las FR a menudo desempeñan un papel en el posicionamiento y alineación adecuados en tres dimensiones de las CDR para una unión óptima al antígeno.

[0033] De hecho, debido a que secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que muestran las propiedades de anticuerpos específicos

- que se producen de forma natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, p. ej., Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; y Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Ver, USA 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco pueden obtenerse de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión de V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias de genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad que contiene mutaciones en todo el gen variable, pero típicamente se agrupan en las CDR. P. ej., las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región estructural 1 y en la porción carboxi terminal de la región estructural 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia completa de ADN de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades de unión similares a las del anticuerpo original. La secuencia parcial de las cadenas pesada y ligera que abarca las regiones CDR suele ser suficiente para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué variable de la línea germinal y qué segmentos de genes de unión contribuyeron a los genes de la variable del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se usa para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para agregar secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa se puede sintetizar para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas, como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.
- [0034]** Por supuesto, la totalidad o porciones de la región marco del anticuerpo descrito en este documento puede usarse en conjunción con las CDR con el fin de optimizar la afinidad, especificidad o cualesquiera otras propiedades deseadas del anticuerpo. Por "anticuerpo" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la totalidad o parte de los genes del anticuerpo. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. El anticuerpo en este documento pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, e incluye anticuerpos que existen naturalmente en cualquier organismo o que están diseñados (p. ej., son variantes),
- [0035]** Por "fragmento de anticuerpo" se entiende cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos en este documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, y los anticuerpos que se han diseñado. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, FC, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena única (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras y regiones variables, y moléculas de andamiaje alternativas, anticuerpos biespecíficos y similares (Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2: 339- 76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395-402). Otra subestructura funcional es una Fv de una sola cadena (scFv), que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, conectadas covalentemente por un conector peptídico (Sz Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas proteínas pequeñas (Mr 25.000) generalmente conservan la especificidad y la afinidad por el antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes, específicas de antígeno. A menos que se indique específicamente lo contrario, las declaraciones y afirmaciones que utilizan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".
- [0036]** Por "conjugado de anticuerpo-fármaco, o "ADC", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de anticuerpo, o fragmento de la misma, que está unida covalentemente a una o más moléculas biológicamente activas. La molécula biológicamente activa puede ser conjugada al anticuerpo a través de un enlazador, polímero u otro enlace covalente.
- [0037]** El término "aromático" o "arilo", como se usa aquí, se refiere a una estructura de anillo cerrado que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye grupos tanto de arilo carbocíclico como de arilo heterocíclico (o "heteroarilo" o "grupos heteroaromáticos"). El grupo aromático carbocíclico o heterocíclico puede contener de 5 a 20 átomos en el anillo. El término incluye anillos monocíclicos unidos covalentemente o anillos policíclicos fusionados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono). Un grupo aromático puede estar sin sustituir o sustituido. Los ejemplos no limitantes de grupos "aromáticos" o "arilo" incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, antraceno y fenantraceno. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento.
- [0038]** Por razones de brevedad, el término "aromático" o "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (incluyendo pero no limitado a, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye tanto arilo como anillos de heteroarilo como se ha

definido anteriormente. Por lo tanto, el término "aralquilo" o "alcarilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluidos, entre otros, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluidos aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluido, entre otros, un grupo metileno) ha sido reemplazado por un heteroátomo, solo a modo de ejemplo, por un átomo de oxígeno. Los ejemplos de tales grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares.

[0039] El término "arileno", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical arilo divalente. Los ejemplos no limitantes de "arileno" incluyen fenileno, piridinileno, pirimidinileno y tiofenileno. Los sustituyentes para los grupos arileno se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento.

[0040] Un "polímero bifuncional", también denominado como un "enlazador bifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos para formar enlaces covalentes o no covalentes. Dichos restos pueden incluir, pero no se limitan a, los grupos laterales en aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. Los otros restos que pueden estar enlazados al enlazador bifuncional o polímero bifuncional pueden ser restos iguales o diferentes. Solo a modo de ejemplo, un enlazador bifuncional puede tener un grupo funcional reactivo con un grupo en un primer péptido, y otro grupo funcional que es reactivo con un grupo en un segundo péptido, formando un conjugado que incluye el primer péptido, el bifuncional enlazador y el segundo péptido. Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, p. ej., la solicitud de patente europea nº 188.256; Las patentes de EE.UU. Nº 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional", también denominado "enlazador multifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales que son capaces de reaccionar con otros restos. Tales fracciones pueden incluir, pero no se limitan a los grupos laterales en aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. (incluyendo pero no limitado a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o un polímero multifuncional puede tener cualquier longitud o peso molecular deseados, y puede seleccionarse para proporcionar una separación o conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas a un compuesto y las moléculas a las que se une o al compuesto.

[0041] El término "biodisponibilidad", como se usa aquí, se refiere a la velocidad y el grado al cual una sustancia o su fracción activa se suministra desde una forma de dosificación farmacéutica y se convierte en disponible en el sitio de acción o en la circulación general. El aumento de la biodisponibilidad se refiere al aumento de la velocidad y el grado en que una sustancia o su resto activo se administra desde una forma de dosificación farmacéutica y está disponible en el sitio de acción o en la circulación general. A modo de ejemplo, un aumento en la biodisponibilidad puede indicarse como un aumento en la concentración de la sustancia o su resto activo en la sangre cuando se compara con otras sustancias o restos activos. Un ejemplo no limitante de un método para evaluar los incrementos en la biodisponibilidad se da en los ejemplos 21-25. Este método se puede utilizar para evaluar la biodisponibilidad de cualquier polipéptido.

[0042] El término "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usa en este documento significa cualquier sustancia que puede afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula, o interacción relativos a un organismo, incluidos, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en este documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, entre otras, cualquier sustancia destinada al diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de los humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, medicamentos duros, medicamentos blandos, profármacos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicas, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con los métodos y composiciones descritos aquí incluyen, entre otros, medicamentos, profármacos, radionúclidos, agentes de imagen, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes contra la ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios y similares.

[0043] Por "modular la actividad biológica" se quiere decir el aumento o disminución de la reactividad de un polipéptido, alterar la selectividad del polipéptido, aumentar o disminuir la selectividad del sustrato del polipéptido. El análisis de la actividad biológica modificada se puede realizar comparando la actividad biológica del polipéptido no natural con la del polipéptido natural.

[0044] El término "biomaterial," como se usa en el presente documento, se refiere a un material derivado biológicamente, incluyendo, pero no limitado a material obtenido de biorreactores y/o a partir de métodos y técnicas recombinantes.

[0045] El término "sonda biofísica," como se usa en el presente documento, se refiere a sondas que pueden detectar o vigilar los cambios estructurales en las moléculas. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, proteínas y la

"sonda biofísica" puede usarse para detectar o monitorear la interacción de proteínas con otras macromoléculas. Los ejemplos de sondas biofísicas incluyen, pero no se limitan a, marcadores de espín, fluoróforos y grupos fotoactivables.

5 **[0046]** El término "biosintéticamente", como se usa aquí, se refiere a cualquier método que utiliza un sistema de traducción (celular o no celular), incluyendo el uso de al menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un ARNt, y un ribosoma. A modo de ejemplo, los aminoácidos no naturales pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales utilizando los métodos y técnicas descritas aquí, "generación de polipéptidos *in vivo* que comprenden aminoácidos no naturales", y en ejemplo no limitativo 20. Además, los métodos para la selección de aminoácidos no naturales útiles que pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales se describen en los ejemplos no limitativos 20.

15 **[0047]** El término "análogo de biotina," o también denominado como "imitador de biotina", como se usa en el presente documento, es cualquier molécula, distinta de la biotina, que se unen con alta afinidad a la avidina y/o estreptavidina.

20 **[0048]** El término "carbonilo", como se usa aquí se refiere a un grupo que contiene a una selección resto del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)2-, y -C(S)-, incluidos, entre otros, grupos que contienen al menos un grupo cetona y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster, incluyendo dichos grupos carbonilo cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres y tioésteres. Además, dichos grupos pueden formar parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

25 **[0049]** El término "grupo de modificación terminal carboxi" se refiere a cualquier molécula que se puede unir a un grupo carboxi terminal. A modo de ejemplo, dichos grupos carboxi terminales pueden estar en el extremo de las moléculas poliméricas, en donde dichas moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. Solo a modo de ejemplo, los grupos de modificación terminal incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Los grupos de modificación terminal se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, que incluyen, entre otros, aumentar la vida media en suero de los péptidos.

35 **[0050]** El término "grupo químicamente escindible", también se hace referencia como "químicamente lábil", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe o escinde con la exposición a ácidos, bases, agentes oxidantes, agentes reductores, iniciadores químicos o iniciadores de radicales.

40 **[0051]** El término "grupo quimioluminiscente," como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que emite luz como resultado de una reacción química sin la adición de calor. A modo de ejemplo solamente, luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) reacciona con oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de una base y un catalizador de metal para producir un producto del estado excitado (3-aminoftalato, 3-APA).

[0052] El término "cromóforo", como se usa aquí, se refiere a una molécula que absorbe luz de longitudes de onda visibles, longitudes de onda UV o longitudes de onda IR.

45 **[0053]** El término "cofactor", como se usa aquí, se refiere a un átomo o molécula esencial para la acción de una molécula grande. Los cofactores incluyen, pero no se limitan a, iones inorgánicos, coenzimas, proteínas o algún otro factor necesario para la actividad de las enzimas. Los ejemplos incluyen hemo en hemoglobina, magnesio en clorofila e iones metálicos para proteínas.

50 **[0054]** "Coplegamiento", como se usa aquí, se refiere a procesos de replegamiento, reacciones, o métodos que emplean al menos dos moléculas que interaccionan entre sí y dan como resultado la transformación de moléculas no plegadas o plegadas incorrectamente a moléculas plegadas correctamente. Solo a modo de ejemplo, el "coplegamiento", emplea al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y dan como resultado la transformación de polipéptidos desplegados o plegados incorrectamente en polipéptidos nativos, correctamente plegados. Dichos polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales y/o al menos un aminoácido no natural.

60 **[0055]** Una "ventana de comparación", como se usa aquí, se refiere a un segmento de una cualquiera de las posiciones contiguas utilizadas para comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente, tales posiciones contiguas incluyen, pero no se limitan a un grupo que consta de aproximadamente 20 a aproximadamente 600 unidades secuenciales, incluidas aproximadamente 50 a aproximadamente 200 unidades secuenciales, y aproximadamente 100 a aproximadamente 150 unidades secuenciales. Solo a modo de ejemplo, tales secuencias incluyen polipéptidos y polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales, con las unidades secuenciales que incluyen, pero no se limitan a aminoácidos naturales y no naturales. Además, solo a modo de ejemplo, tales secuencias incluyen polinucleótidos con nucleótidos que son las unidades secuenciales correspondientes. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las

secuencias para comparación se puede realizar, entre otras, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Mates.* 2:482C, por el algoritmo de alineación 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. EE.UU.* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (ver, p. ej., Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

[0056] A modo de ejemplo, un algoritmo que puede ser utilizado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) *NuCl. 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 públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la nucleótidos alineación. El programa BLASTN (para secuencias de) utiliza como valores predeterminados 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 valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff (1992) *ProC. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

[0057] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul (1993) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. P. ej., un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, o menor que aproximadamente 0,01, o menor que aproximadamente 0,001,

[0058] El término "variantes modificadas de forma conservadora" se aplica a la vez natural y no natural de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de los mismos, con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, "variantes modificadas de forma conservadora" se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos naturales y no naturales, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. P. ej., los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Así, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácido nucleico natural o no natural en el presente documento que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico natural o no natural. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano, puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

[0059] En cuanto a las secuencias de aminoácidos, sustituciones individuales, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptidos, o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un único aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de los recursos naturales y los aminoácidos no naturales en la secuencia codificada son una "variante modificada conservativamente" en la que la alteración produce la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido natural y no natural por aminoácidos químicamente similares. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de los métodos y composiciones descritos en este documento.

[0060] Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Los siguientes ocho grupos 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);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
 7) Serina(s), Treonina (T); y
 8) Cisteína (C), Metionina (M)

5 (Ver, p. ej., Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (WH Freeman & Co; 2ª edición (diciembre de 1993).

10 **[0061]** Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, las versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces anulares saturados, parcialmente insaturados y totalmente insaturados. Además, para heterocicloalquilo, un heterátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. El heteroátomo puede incluir, pero no se limita a, oxígeno, nitrógeno o azufre. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Además, el término abarca estructuras multicíclicas, incluidas, entre otras, estructuras de anillos bicíclicos y tricíclicos. De manera similar, el término "heterocicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

20 **[0062]** El término "ciclodextrina", como se usa aquí, se refiere a los hidratos de carbono cíclicos que consisten en al menos seis a ocho moléculas de glucosa en una formación de anillo. La parte exterior del anillo contiene grupos solubles en agua; en el centro del anillo hay una cavidad relativamente no polar capaz de acomodar moléculas pequeñas.

25 **[0063]** El término "citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que daña a las células,

30 **[0064]** "Agente desnaturalizante" o "desnaturalizante", como se usa aquí, se refiere a cualquier compuesto o material que provocará un despliegue reversible de un polímero. Solo a modo de ejemplo, el "agente desnaturalizante" o "desnaturalizante" puede causar un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturalizante o desnaturalizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del agente desnaturalizante particular o desnaturalizante. A modo de ejemplo, los agentes desnaturalizantes o desnaturalizantes incluyen, pero no se limitan a, caótopos, detergentes, disolventes orgánicos, miscibles con agua, fosfolípidos, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de caótopos incluyen, entre otros, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los ejemplos no limitantes de detergentes pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes como el dodecilo sulfato de sodio o los éteres de polioxietileno (p. ej., detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes suaves no iónicos (p. ej., digitonina), detergentes catiónicos suaves tales como N->2,3-(Dioleyoxi)-propilo-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (p. ej., colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes bipolares que incluyen, entre otros, sulfobetainas (Zwittergent), Sulfato de 3-(3-clolamidopropilo) dimetilamonio-1-propano (CHAPS), y sulfonato de 3-(3-cloidopropilo) dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO). Los ejemplos no limitantes de disolventes orgánicos miscibles con agua incluyen, entre otros, acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente alcoholes C2 - C4 como etanol o isopropanol), o alcandioles inferiores (alcandioles C2 - C4 como etilenglicol) pueden ser utilizados como desnaturalizantes. Los ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos naturales tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados de fosfolípidos sintéticos o variantes tales como dihexanoilfosfina o dihidanilfosfosfina.

45 **[0065]** El término "funcionalidad deseada" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo seleccionado de una etiqueta; un tinte; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un reticulador fotográfico; un compuesto citotóxico; una droga; una etiqueta de afinidad; una etiqueta de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metal; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; una etiqueta de giro; un fluoróforo; un resto que contiene metal; una fracción radiactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; un resto fotocurado; una fracción excitable de radiación actínica; un ligando; un resto fotoisomerizable; biotina; un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescalable; una cadena lateral alargada; un azúcar ligado al carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; un resto tóxico; un resto isotópicamente marcado; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso de electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo (en cuyo caso, el agente biológicamente activo puede incluir un agente con actividad terapéutica y el polipéptido de aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado puede servir como agente co-terapéutico con el agente terapéutico adjunto o como un medio para administrar el agente terapéutico a un sitio deseado dentro de un organismo); una etiqueta detectable; una pequeña molécula; un ácido ribonucleico inhibidor; un radionucleótido; un agente de captura de neutrones; un derivado de la biotina; puntos cuánticos); un nanotransmisor; un radiotransmisor; un abzima, un activador complejo activado, un

virus, un adyuvante, un aglicano, un alergano, un angiostatina, un antihormona, un antioxidante, un aptámero, una guía de ARN, una saponina, un vector lanzadero, una macromolécula, un mimotopo, un receptor, una micela inversa, y cualquier combinación de los mismos.

5 **[0066]** El término "diamina," como se usa en el presente documento, se refiere a grupos/moléculas que comprenden al menos dos grupos funcionales de amina, incluyendo, pero no limitado a, un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina. Además, dichos grupos pueden formar parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

10 **[0067]** El término "marcador detectable", como se usa aquí, se refiere a una etiqueta que puede ser observable utilizando técnicas analíticas, incluyendo, pero no limitado a, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de espín electrónico, espectroscopía de absorbanza ultravioleta/visible, espectrometría de masas, resonancia nuclear magnética, resonancia magnética y métodos electroquímicos.

15 **[0068]** El término "dicarbonilo" tal como se utiliza aquí se refiere a un grupo que contiene al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, y -C(S)-, incluidos, entre otros, grupos 1,2-dicarbonilo, grupos 1,3-dicarbonilo y grupos 1,4-dicarbonilo, y grupos que contienen al menos un grupo cetona, y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster. Dichos grupos dicarbonilo incluyen dicetonas, cetoaldehídos, cetoácidos, cetoésteres y cetotioésteres. Además, dichos grupos pueden formar parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas. Los dos restos en el grupo dicarbonilo pueden ser iguales o diferentes, y pueden incluir sustituyentes que producirían, solo a modo de ejemplo, un éster, una cetona, un aldehído, un tioéster o una amida, en cualquiera de los dos restos.

20 **[0069]** El término "fármaco", como se usa aquí, se refiere a cualquier sustancia usada en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento, o cura de una enfermedad o condición.

[0070] El término "colorante", como se usa aquí, se refiere a una sustancia soluble, colorante que contiene un cromóforo.

30 **[0071]** El término "cantidad eficaz", como se usa aquí, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un ser compuesto administrado que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. El resultado puede ser una reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto que se administra incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado o polipéptido de no aminoácido modificado. Las composiciones que contienen tales polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. Una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse utilizando técnicas, como un estudio de aumento de la dosis.

45 **[0072]** El término "grupo denso de electrones", como se usa aquí, se refiere a un grupo que dispersa electrones cuando se irradia con un haz de electrones. Dichos grupos incluyen, pero no se limitan a, molibdato de amonio, subnitrito de bismuto yoduro de cadmio, 99%, carbohidracida, hexahidrato de cloruro férrico, hexametilentetramina, 98,5%, tricloruro de indio anhidro, nitrato de lantano, acetato de plomo, hidrato de acetato de plomo, nitrato de plomo, ácido periódico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotúngico, ferricianuro de potasio, ferrocianuro de potasio, rojo de rutenio, nitrato de plata, proteinato de plata (Ensayo de Ag: 8,0-8,5%) "Fuerte", tetrafenilporfina de plata (S-TPPS), cloroaurato de sodio, tungstato de sodio, nitrato de talio, tiosemicarbazida (TSC), acetato de uranilo, nitrato de uranilo y sulfato de vanadilo.

50 **[0073]** El término "agente de transferencia de energía", como se usa aquí, se refiere a una molécula que puede o bien donar o aceptar energía procedente de otra molécula. Solo a modo de ejemplo, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es un proceso de acoplamiento dipolo-dipolo mediante el cual la energía del estado excitado de una molécula donante de fluorescencia se transfiere de manera no radiativa a una molécula aceptora no excitada que luego emite fluorescentemente la energía donada a una longitud de onda más larga.

60 **[0074]** Los términos "mejorar" o "mejorado" significa aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración un efecto deseado. A modo de ejemplo, "potenciar" el efecto de los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o en duración, el efecto de los agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad efectiva de mejora", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad adecuada para mejorar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se usa en un paciente, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el criterio del médico tratante.

65 **[0075]** Tal como se utiliza aquí, el término "eucariota" se refiere a organismos pertenecientes al dominio filogenético

Eucarya, incluyendo pero no limitado a animales (incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluidos, entre otros, monocots, dicots y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios y protistas.

5 **[0076]** El término "ácido graso", como se usa aquí, se refiere a ácidos carboxílicos con aproximadamente C6 o de la cadena lateral hidrocarbonada más larga,

[0077] El término "fluoróforo", como se usa aquí, se refiere a una molécula que tras la excitación emite fotones y es por lo tanto fluorescente.

10 **[0078]** Los términos "grupo funcional", "grupo activo", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "grupo químicamente reactivo", como se usan en este documento, se refieren a las porciones o unidades de una molécula en la que se producen reacciones químicas. Los términos son de alguna manera sinónimos en las técnicas químicas y se usan en este documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

15 **[0079]** El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

20 **[0080]** El término "haloacilo," como se usa en el presente documento, se refiere a grupos acilo que contienen restos de halógeno, incluyendo, pero no limitado a, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares.

[0081] El término "haloalquilo", como se usa aquí, se refiere a grupos alquilo que contienen restos de halógeno, incluyendo, pero no limitado a, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$ y similares.

25 **[0082]** El término "heteroalquilo", como se usa aquí, se refiere a cadena lineal o ramificada, o los radicales hidrocarbonados cíclicos, o combinaciones de los mismos, que consiste en un grupo alquilo y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar oxidados opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El (los) heteroátomo(s) O, N y S y Si puede(n) colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Además, hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, como, p. ej., $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$.

35 **[0083]** Los términos "enlace basado en heterocíclico" o "enlace de heterociclo" se refieren a un resto formado a partir de la reacción de un grupo dicarbonilo con un grupo diamina. El producto de reacción resultante es un heterociclo, que incluye un grupo heteroarilo o un grupo heterocicloalquilo. El grupo heterociclo resultante sirve como un enlace químico entre un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácido no natural y otro grupo funcional. En una realización, el enlace heterociclo incluye un enlace heterociclo que contiene nitrógeno, que incluye a modo de ejemplo solamente un enlace pirazol, un enlace pirrol, un enlace indol, un enlace benzodiazepina y un enlace pirazalona.

40 **[0084]** De manera similar, el término "heteroalquileno" se refiere a un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no limitado por, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. Para los grupos heteroalquileno, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos de los extremos de la cadena (incluidos, entre otros, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, aminoalquilenoxi y similares). Aún más, para los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, la orientación en la que se escribe la fórmula del grupo de enlace N-O implica ninguna orientación del grupo de enlace. A modo de ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R'$ representa tanto $-C(O)_2R'$ como $-R'C(O)_2$.

50 **[0085]** El término "heteroarilo" o "heteroaromático", como se usa aquí, se refiere a grupos arilo que contienen al menos un heteroátomo seleccionado de N, O, y S; en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitativos de grupos heteroarilo incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo.

60 **[0086]** El término "homoalquilo", como se usa aquí, se refiere a grupos alquilo que son grupos de hidrocarburos.

[0087] El término "idéntico", como se usa aquí, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Además, el término "sustancialmente idéntico", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias que tienen un porcentaje de unidades secuenciales que son iguales cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada según se mide usando

algoritmos de comparación o por alineación manual e inspección visual. Solo a modo de ejemplo, dos o más secuencias pueden ser "sustancialmente idénticas" si las unidades secuenciales son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región específica. Dichos porcentajes describen el "porcentaje de identidad" de dos o más secuencias. La identidad de una secuencia puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75-100 unidades secuenciales de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 unidades secuenciales de longitud, o, cuando no se especifique, en toda la secuencia. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Sólo a modo de ejemplo, dos o más secuencias de polipéptidos son idénticas cuando los residuos de aminoácidos son iguales, mientras que dos o más secuencias polipeptídicas son "sustancialmente idénticas" si los residuos de aminoácidos son aproximadamente 60% idénticos, aproximadamente 65% idénticos, aproximadamente 70% idénticos, aproximadamente 75% idénticos, aproximadamente 80% idénticos, aproximadamente 85% idénticos, aproximadamente 90% idénticos o aproximadamente 95% idénticos en una región específica. La identidad puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o, cuando no se especifica, a través de la secuencia completa de una secuencia polipeptídica. Además, solo a modo de ejemplo, dos o más secuencias de polinucleótidos son idénticas cuando los residuos de ácido nucleico son iguales, mientras que dos o más secuencias de polinucleótidos son "sustancialmente idénticas" si los residuos de ácido nucleico son aproximadamente 60% idénticos, aproximadamente 65% idénticos, aproximadamente 70% idénticos, aproximadamente 75% idénticos, aproximadamente 80% idénticos, aproximadamente 85% idénticos, aproximadamente 90% idénticos, o aproximadamente 95% idénticos en una región específica. La identidad puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 ácidos nucleicos de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 ácidos nucleicos de longitud, o, cuando no se especifica, a través de la secuencia completa de una secuencia de polinucleótidos.

[0088] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se ingresan en una computadora, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia calcula luego el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

[0089] El término "inmunogenicidad", como se usa aquí, se refiere a una respuesta de anticuerpo a la administración de un fármaco terapéutico. La inmunogenicidad frente a polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos puede obtenerse utilizando ensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos de polipéptidos de aminoácidos no naturales en fluidos biológicos. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo luminiscente (LIA) e inmunoensayo fluorescente (FIA). El análisis de la inmunogenicidad hacia polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos implica comparar la respuesta de anticuerpos en la administración de polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos con la respuesta de anticuerpos en la administración de polipéptidos de aminoácidos naturales terapéuticos.

[0090] El término "agente intercalante", también denominado "grupo intercalantes," como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia química que se puede insertar en el espacio intramolecular de una molécula o el espacio intermolecular entre las moléculas. A modo de ejemplo, solo un agente o grupo intercalador puede ser una molécula que se inserta en las bases apiladas de la doble hélice del ADN.

[0091] El término "aislado", como se usa aquí, se refiere a la separación y la eliminación de un componente de interés a partir de componentes que no sean de interés. Las sustancias aisladas pueden estar en estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo pero sin limitarse a una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede ser parte de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se pueden determinar utilizando técnicas de química analítica que incluyen, entre otras, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, cuando se aísla un componente de interés y es la especie predominante presente en una preparación, se describe el componente. aquí como sustancialmente purificado, el término "purificado", como se usa en el presente documento, puede referirse a un componente de interés que es al menos puro al 85%, al menos al 90% puro, al menos al 95% puro, al menos al 99% o más puro. Solo a modo de ejemplo, los ácidos nucleicos o proteínas se "aislan" cuando dichos ácidos nucleicos o proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en el estado natural, o cuando el ácido nucleico o la proteína se han concentrado a un nivel superior a la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*. Además, a modo de ejemplo, un gen se aísla cuando se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés.

[0092] El término "etiqueta", como se usa aquí, se refiere a una sustancia que se incorpora en un compuesto y se

detecta fácilmente, por lo que su distribución física se puede detectar y/o monitorizar.

[0093] El término "enlace", como se usa aquí para referirse a enlaces o restos químicos formados a partir de una reacción química entre el grupo funcional de un enlazador y otra molécula. Dichos enlaces pueden incluir, pero no se limitan a, enlaces covalentes y enlaces no covalentes, mientras que dichos restos químicos pueden incluir, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, ésteres de fosfato de iminas, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos y enlaces oligonucleotídicos. Los enlaces hidrolíticamente estables significan que los enlaces son sustancialmente estables en el agua y no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, que incluyen, entre otros, condiciones fisiológicas durante un período prolongado de tiempo, tal vez incluso indefinidamente. Los enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, p. ej., sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significan que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Solo a modo de ejemplo, el PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en el esqueleto del polímero o en el grupo enlazador entre el esqueleto del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Tales enlaces degradables incluyen, pero no se limitan a, enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo, en donde dichos grupos éster generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente biológicamente activo. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, entre otros, enlaces carbonato; enlaces de imina resultaron de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces de hidrazona que son producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, que incluyen pero no se limitan a un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidita, que incluyen pero no se limitan al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

[0094] Los términos "medio" o "medios", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier medio de cultivo utilizado para crecer y células y/o productos de la cosecha expresada y/o secretada por tales células. Tales "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, soluciones, soportes sólidos, semisólidos o rígidos que pueden soportar o contener cualquier célula huésped, incluidas, a modo de ejemplo, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células huésped de planta, células huésped eucariotas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procarióticas, E. coli o células huésped de pseudomonas, y contenido celular. Dichos "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, medio o medios en donde se ha desarrollado la célula huésped en la que se ha secretado un polipéptido, incluido el medio antes o después de una etapa de proliferación. Dichos "medio" o "medios" también incluyen, pero no se limitan a, tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, a modo de ejemplo, un polipéptido producido intracelularmente y las células huésped se lisan o se rompen para liberar el polipéptido.

[0095] El término "metabolito", como se usa aquí, se refiere a un derivado de un compuesto, a modo de polipéptido aminoácido natural ejemplar, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o un aminoácido modificado no polipéptido natural, que se forma cuando el compuesto, a modo de ejemplo, polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado o polipéptido de aminoácido no natural modificado, se metaboliza, el término "metabolito farmacéuticamente activo" o "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado, o un polipéptido de aminoácido natural modificado. polipéptido de aminoácido, que se forma cuando dicho compuesto, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado, o polipéptido aminoácido modificado no natural, se metaboliza.

[0096] El término "metabolizado", como se usa aquí, se refiere a la suma de los procesos por los cuales una sustancia particular es cambiada por un organismo. Tales procesos incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas. Se puede obtener más información sobre el metabolismo en The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Edición, McGraw-Hill (1996). Solo a modo de ejemplo, los metabolitos de los polipéptidos de aminoácidos naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden identificarse mediante la administración de los polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados a un huésped y análisis de muestras de tejido del huésped, o por incubación de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados con células hepáticas *in vitro* y análisis de los compuestos resultantes.

[0097] El término "quelante de metales", como se usa aquí, se refiere a una molécula que forma un complejo metálico con iones metálicos. A modo de ejemplo, tales moléculas pueden formar dos o más enlaces de coordinación con un ion metálico central y pueden formar estructuras en anillo.

[0098] El término, como se usa en el presente documento "resto, que contiene metal", se refiere a un grupo que

contiene un ion metálico, átomo o partícula. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, iones de metales quelados (tales como níquel, hierro y platino) y nanopartículas metálicas (tales como níquel, hierro y platino).

5 **[0099]** El término "resto que incorpora un átomo pesado," como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que incorpora un ion de átomo que es generalmente más pesado que el carbono. Dichos iones o átomos incluyen, entre otros, silicio, tungsteno, oro, plomo y uranio.

10 **[0100]** El término "modificado", como se usa aquí, se refiere a la presencia de un cambio a un ácido natural de amino, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural. Dichos cambios, o modificaciones, pueden obtenerse mediante modificaciones posteriores a la síntesis de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales, o por co-traducción, o por modificación post-traducciona de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. La forma "modificada o no modificada" significa que el aminoácido natural, el aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural que se están discutiendo están opcionalmente modificados, es decir, el aminoácido natural, el aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural en discusión pueden modificarse o no modificarse.

20 **[0101]** Como se usa en este documento, el término "vida media en suero modulada" se refiere a cambios positivos o negativos en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa o molécula modificada biológicamente activa, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. Correlación de la concentración sérica con el tiempo permite el cálculo de la vida media sérica. A modo de ejemplo, la vida media en suero modulada puede ser un aumento en la vida media en suero, lo que puede permitir una mejora de los regímenes de dosificación o evitar efectos tóxicos. Tales aumentos en el suero pueden ser al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente diez veces. Los métodos para evaluar la vida media en suero son conocidos en la técnica y se pueden usar para evaluar la vida media en suero de anticuerpos y conjugados de fármaco de anticuerpo de la presente invención.

35 **[0102]** El término "vida media terapéutica modulada", como se usa aquí, se refiere a un cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biológicamente activa modificada, con respecto a su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la vida media terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos de tiempo después de la administración. El aumento de la vida media terapéutica puede permitir un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. A modo de ejemplo, el aumento de la vida media terapéutica puede resultar de una mayor potencia, un aumento o disminución de la unión de la molécula modificada a su objetivo, un aumento o disminución en otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada, o un aumento de la vida media terapéutica. o disminución de la degradación de las moléculas por parte de enzimas como, p. ej., solo proteasas. Los métodos para evaluar la vida media terapéutica son conocidos en la técnica y se pueden usar para evaluar la vida media terapéutica de anticuerpos y conjugados de fármaco de anticuerpo de la presente invención.

50 **[0103]** El término "nanopartículas", como se usa aquí, se refiere a una partícula que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1 nm.

[0104] El término "casi estequiométrico," como se utiliza aquí, se refiere a la relación de los moles de los compuestos que participan en una reacción química que es aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,5.

55 **[0105]** Como se usa en este documento, el término "no eucariota" se refiere a organismos no eucariotas. A modo de ejemplo, un organismo no eucariótico puede pertenecer a las Eubacterias (que incluye, entre otras, Escherichia coli, Thermus thermophilus o Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida), dominio filogenético o el Archaea, que incluye, pero no se limita a, Metanococcus jannaschii, Metanobacterium thermoautotrophicum, Archaeoglobus fulgidus, Pyrococcus furiosus, Pyrococcus horikoshii, Aeuropyrum pernix, o Halobacterium tales como Haloferax volcanii y especies de Halobacterium NRC-1, o dominio filogenético.

65 **[0106]** Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirolisina o selenocisteína. Otros términos que se pueden usar de manera sinónima con el término "aminoácido no natural" son "aminoácido no codificado de forma natural", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural", y están separados por un guión y no están divididos versiones de los mismos. El término "aminoácido no

natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se producen naturalmente por modificación de un aminoácido codificado de forma natural (incluidos, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero no están incorporados en una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de traducción. Los ejemplos de aminoácidos naturales que no están codificados naturalmente incluyen, entre otros, N-acetilglucosaminilo-L-serina, N-acetilglucosaminilo-L-treonina y O-fosfotirosina. Además, el término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que no se producen naturalmente y pueden obtenerse sintéticamente o pueden obtenerse por modificación de aminoácidos no naturales.

[0107] El término "ácido nucleico", como se usa aquí, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. Solo a modo de ejemplo, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a los ácidos nucleicos de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, ANP (ácido peptidónucleico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares); (iii) sus variantes modificadas conservativamente (incluidas, entre otras, las sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias y las secuencias explícitamente indicadas. A modo de ejemplo, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka y otros, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985) y Rossolini y otros, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)).

[0108] El término "agente oxidante", como se usa aquí, se refiere a un compuesto o material que es capaz de eliminar un electrón de un compuesto que está siendo oxidado. A modo de ejemplo, los agentes oxidantes incluyen, pero no se limitan a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitól oxidado y oxígeno. Una amplia variedad de agentes oxidantes son adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

[0109] El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un material, incluyendo pero no limitado, a una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

[0110] El término "marcador de fotoafinidad," como se utiliza aquí, se refiere a una etiqueta con un grupo, el cual, tras la exposición a la luz, forma un enlace con una molécula para la que la etiqueta tiene una afinidad. Sólo a modo de ejemplo, dicho enlace puede ser covalente o no covalente.

[0111] El término "resto fotoajulado", como se usa aquí, se refiere a un grupo que, después de la iluminación en ciertas longitudes de onda, se une covalentemente o no covalentemente otros iones o moléculas.

[0112] El término "grupo fotoescindible," tal como se utiliza aquí, se refiere a un grupo que se rompe con la exposición a la luz.

[0113] El término "fotoentrecruzador", como se usa aquí, se refiere a un compuesto que comprende dos o más grupos funcionales que, al exponerse a la luz, son reactivos y forman un enlace covalente o no covalente con dos o más moléculas monoméricas o poliméricas.

[0114] El término "resto fotoisomerizable," como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo en el que tras la iluminación con luz cambia de una forma isomérica a otra.

[0115] El término "polialquilenglicol", como se usa aquí, se refiere a polioles de poliéter poliméricos lineales o ramificados. Dichos polialquilenglicoles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. Otras realizaciones ejemplares se enumeran, p. ej., en catálogos de proveedores comerciales, como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001). Solo a modo de ejemplo, tales polioles poliéter poliméricos tienen pesos moleculares promedio entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. A modo de ejemplo, tales polioles poliéter poliméricos incluyen, pero no se limitan a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero no limitado a aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente

900 Da, aproximadamente 800 Da, aproximadamente 700 Da, aproximadamente 600 Da, aproximadamente 500 Da, 400 Da, aproximadamente 300 Da, aproximadamente 200 Da y aproximadamente 100 Da, En algunas realizaciones. el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da, En algunas realizaciones. el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da, En algunas realizaciones. el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones. el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da, En algunas realizaciones. el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da, En algunas realizaciones. la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos. entre otros. aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da y aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, y aproximadamente 1.000 Da. En algunas realizaciones. el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones. el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones. el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones. el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da.

[0116] El término "polímero", como se usa aquí, se refiere a una molécula compuesta de subunidades repetidas. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos, o polisacáridos o polialquilenglicoles.

[0117] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un aminoácido no natural. Además, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

[0118] El término "post-traduccionalmente modificado" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce después de tal aminoácido se ha incorporado en traslación en una cadena polipeptídica. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, modificaciones co-traductoras *in vivo*, modificaciones co-traductoras *in vitro* (como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones postraduccionales *in vivo* y modificaciones postraduccionales *in vitro*.

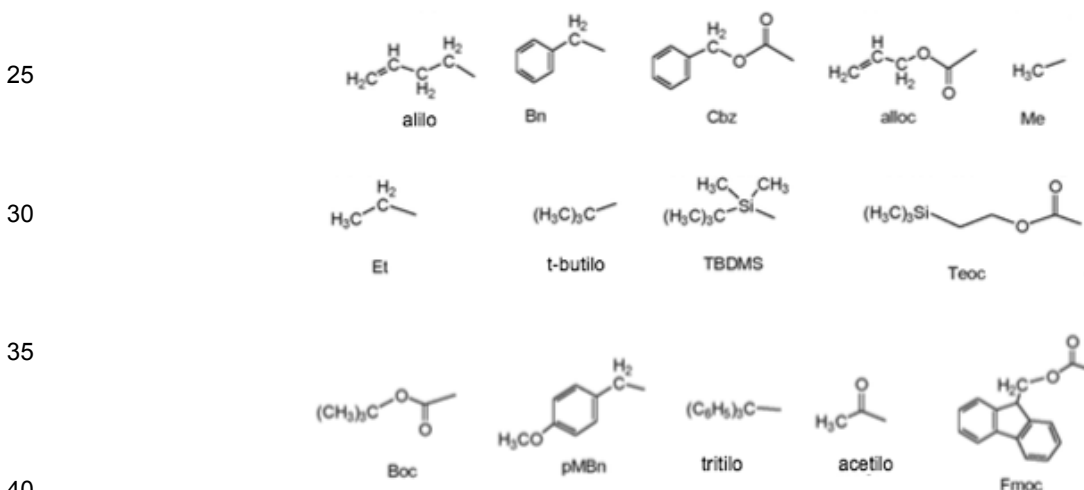
[0119] Los términos "profármaco" o "profármaco farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, se refiere a un agente que es convertido en el fármaco original *in vivo* o *in vitro*, en el que que no anula la actividad biológica o las propiedades del fármaco, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido. Los profármacos son generalmente precursores de fármacos que, después de la administración a un sujeto y su posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa a través de algún proceso, como la conversión por una vía metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad o alguna otra propiedad a la droga. Una vez que el grupo químico se ha separado y/o modificado del profármaco, se genera el fármaco activo. Los profármacos se convierten en un fármaco activo dentro del cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar propiedades fisicoquímicas mejoradas, como mejor solubilidad, características de administración mejoradas, como dirigirse específicamente a una célula, tejido, órgano o ligando en particular, y valor terapéutico mejorado del medicamento. Los beneficios de tales profármacos incluyen, entre otros, (i) facilidad de administración en comparación con el fármaco original; (ii) el profármaco puede estar biodisponible por administración oral, mientras que el progenitor no lo está; y (iii) el profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco original. Un profármaco incluye un derivado farmacológicamente inactivo o de actividad reducida de un fármaco activo. Los profármacos pueden diseñarse para modular la cantidad de un fármaco o molécula biológicamente activa que alcance un sitio de acción deseado mediante la manipulación de las propiedades de un fármaco, como las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un polipéptido de aminoácido no natural que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que luego se hidroliza metabólicamente para el ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en

agua es beneficiosa. Los profármacos pueden diseñarse como derivados de fármacos reversibles, para usarlos como modificadores para mejorar el transporte de fármacos a tejidos específicos del sitio.

5 [0120] El término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a esa cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido natural o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud, peso y similares del paciente. Se considera bien dentro de la experiencia de la técnica que uno determine tales cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación de rutina, que incluye, entre otros, un ensayo clínico de aumento de la dosis.

15 [0121] El término "protegido", como se usa aquí, se refiere a la presencia de un "grupo protector" o resto que previene 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. Solo a modo de ejemplo, (i) si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse entre *tert*-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); (ii) si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopididisulfuro; y (iii) si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, como el ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o *tert*-butilo.

20 [0122] Solo a modo de ejemplo, los grupos de bloqueo/protección pueden seleccionarse de:



45 [0123] Además, los grupos protectores incluyen, entre otros, grupos fotolábiles, como Nvoc y MeNvoc y otros grupos protectores conocidos en la técnica. Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

50 [0124] El término "resto radiactivo", como se usa aquí, se refiere a un grupo cuyos núcleos emiten espontáneamente radiación nuclear, como partículas alfa, beta o gamma; en donde, las partículas alfa son núcleos de helio, las partículas beta son electrones y las partículas gamma son fotones de alta energía.

[0125] El término "compuesto reactivo", como se usa aquí, se refiere a un compuesto que en condiciones apropiadas es reactivo frente a otro átomo, molécula o compuesto.

55 [0126] El término "célula huésped recombinante", también denominado "célula huésped", se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en el que los métodos utilizados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, pero no se limitan a, captación directa, transducción, apareamiento, u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. Solo a modo de ejemplo, dicho polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, que incluye pero no se limita a un plásmido, o puede integrarse en el genoma del huésped.

60 [0127] El término "agente activo redox", como se usa aquí, se refiere a una molécula que se oxida o reduce otra molécula, por lo que el agente activo redox se reduce o se oxida. Los ejemplos de agente activo redox incluyen, pero no se limitan a, ferroceno, quinonas, complejos Ru^{2+/3+}, complejos Co^{2+/3+} y complejos Os^{2+/3+}.

65 [0128] El término "agente reductor", como se usa aquí, se refiere a un compuesto o material que es capaz de añadir un electrón a un compuesto que está siendo reducido. A modo de ejemplo, los agentes reductores incluyen, pero no se limitan a, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioneitol, cisteína, cisteamina (2-aminoetanotiol) y glutatión reducido. Dichos agentes reductores se pueden usar, solo a modo de ejemplo, para mantener los grupos sulfhidrilo

en el estado reducido y para reducir los enlaces de disulfuro intra o intermoleculares.

5 **[0129]** El "replegamiento", como se usa en el presente documento, describe cualquier proceso, reacción o método que transforma un estado plegado o desplegado incorrectamente en una conformación nativa o correctamente plegada. Solo a modo de ejemplo, el replegamiento transforma un enlace disulfuro que contiene polipéptidos de un estado plegado o desplegado incorrectamente a una conformación nativa o plegada adecuadamente con respecto a los enlaces disulfuro. Dichos polipéptidos que contienen enlaces disulfuro pueden ser polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales.

10 **[0130]** El término "resina", como se usa aquí, se refiere a peso molecular alto, perlas de polímero insolubles, a modo de ejemplo solamente, tales perlas pueden ser utilizadas como soportes para la síntesis de péptidos en fase sólida, o sitios para la unión de las moléculas antes de purificación.

15 **[0131]** El término "sacárido", como se usa aquí, se refiere a una serie de carbohidratos, incluyendo pero no limitado a azúcares, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

20 **[0132]** El término "seguridad" o "perfil de seguridad", como se usa aquí, se refiere a los efectos que podrían estar relacionados con la administración de un fármaco en relación con el número de veces que el fármaco ha sido administrado. A modo de ejemplo, se dice que un medicamento que se ha administrado muchas veces y que produce solo efectos secundarios leves o no tiene un excelente perfil de seguridad. En el ejemplo 26 se proporciona un ejemplo no limitativo de un método para evaluar el perfil de seguridad. Este método puede usarse para evaluar el perfil de seguridad de cualquier polipéptido.

25 **[0133]** La frase "hibrida selectivamente a" o "hibrida específicamente a", como se usa en este documento, se refiere a la unión, dúplex o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en un complejo mezcla que incluye, pero no se limita a, ADN o ARN celular total o de biblioteca.

30 **[0134]** El término "marcador de espín," como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas que contienen un átomo o un grupo de átomos que presentan un espín electrónico desapareado (es decir, un grupo paramagnético estable) que se puede detectar por espectroscopia de resonancia de espín de electrones y puede ser unido a otra molécula. Dichas moléculas de marca de giro incluyen, pero no se limitan a, radicales de nitrilo y nitróxidos, y pueden ser etiquetas de giro único o etiquetas de doble giro.

35 **[0135]** El término "estequiométrica", como se usa aquí, se refiere a la relación de los moles de los compuestos que participan en una reacción química ser aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1,

40 **[0136]** El término "-similar a estequiométrico," como se usa aquí, se refiere a una reacción química que convierte estequiométrica o casi estequiométrica de los cambios en las condiciones de reacción o en presencia de aditivos. Tales cambios en las condiciones de reacción incluyen, entre otros, un aumento de la temperatura o un cambio en el pH. Tales aditivos incluyen, pero no se limitan a, acelerantes.

45 **[0137]** La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN, PNA u otros miméticos de ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos, bajo condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura. A modo de ejemplo, en condiciones rigurosas, una sonda hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (que incluye, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca) pero no hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. A modo de ejemplo, las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, (i) aproximadamente 5-10°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos; (ii) la concentración de sal es de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (incluidas, entre otras, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (incluidas, entre otras, más de 50 nucleótidos); (iii) la adición de agentes desestabilizantes que incluyen, entre otros, formamida, (iv) 50% de formamida, 5X SSC y 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5X SSC, aproximadamente 1% de SDS, incubando a 65°C, con lavado en 0,2X SSC, y aproximadamente 0,1% SDS a 65°C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 120 minutos. Solo a modo de ejemplo, la detección de hibridación selectiva o específica, incluye, pero no se limita a, una señal positiva al menos dos veces en segundo plano. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

60

65 **[0138]** El término "sujeto" como se utiliza aquí, hace referencia a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. Solo a modo de ejemplo, un sujeto puede ser, pero no se limita a, un mamífero que incluye, pero no se limita a, un ser humano.

[0139] El término "sustancialmente purificado", como se usa aquí, se refiere a un componente de interés que puede ser sustancial o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el componente de interés antes de la purificación. Solo a modo de ejemplo, un componente de interés puede estar "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, o menos de aproximadamente el 1% (en peso seco) de componentes contaminantes. Por lo tanto, un componente de interés "sustancialmente purificado" puede tener un nivel de pureza de aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más. Solo a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural puede purificarse a partir de una célula nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales producidos de forma recombinante o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural puede ser "sustancialmente purificado" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, o menos de aproximadamente el 1% (en peso seco) de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando las células huésped producen un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, o aproximadamente el 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando las células huésped producen un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4g/L, aproximadamente 3g/L, aproximadamente 2g/L, aproximadamente 1g/L, aproximadamente 750mg/L, aproximadamente 500mg/L, aproximadamente 250mg/L, aproximadamente 100mg/L, aproximadamente 50mg/L, aproximadamente 10mg/L, o aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos naturales "sustancialmente purificados" o los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden tener un nivel de pureza de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o más, según lo determinen los métodos apropiados, incluidos, entre otros, Análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

[0140] El término "sustituyentes" también hace referencia como "sustituyentes que no interfieren" "se refiere a grupos que pueden ser usados para sustituir a otro grupo en una molécula. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, halo, C₁-C₁₀ alquilo, C₂-C₁₀ alquenilo, C₂-C₁₀ alquinilo, C₁-C₁₀ alcoxi, C₅-C₁₂ aralquilo, C₃-C₁₂ cicloalquilo, C₄-C₁₂ cicloalquenilo, fenilo, fenilo sustituido, toluolilo, xilenilo, bifenilo, C₂-C₁₂ alcoxiarilo, C₅-C₁₂ alcoxialquilo, C₅-C₁₂ ariloxialquilo, C₇-C₁₂ oxiarilo, C₁-C₆ alquilsulfonilo, C₁-C₁₀ alquilsulfonilo, -(CH₂)_m-O-(C₁-C₁₀ alquilo) en la que m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO₂, -CN, -NRC(O)-(alquilo C₁-C₁₀), -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀), alquiltioalquilo C₂-C₁₀, -C(O)O-(alquilo C₁-C₁₀), -OH, -SO₂, =S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀)-CF₃, -C(O)-CF₃, -C(O)NR₂, -(arilo C₁-C₁₀)-S-(arilo C₆-C₁₀), -C(O)-(arilo C₆-C₁₀), -(CH₂)_m-O-(CH₂)_m-O-(alquilo C₁-C₁₀) en donde cada m es de 1 a 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos, y similares. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o alcarilo. Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían al escribir la estructura de derecha a izquierda; p. ej., -CH₂O- es equivalente a -OCH₂-.

[0141] Solo a modo de ejemplo, los sustituyentes de radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos los grupos denominados alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquilenilo) incluyen, pero no se limitan a: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN y -NO₂. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, que incluye pero no se limita a, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos aralquilo. Cuando dos grupos R se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. P. ej., -NR₂ pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo.

[0142] A modo de ejemplo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN, -NO₂, -R, -N₃, -CH(Ph)₂, fluoro (alcoxi C₁-C₄) y flúor (C₁-C₄)alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas

en el sistema de anillos aromáticos; y donde cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

5 **[0143]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural y/o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado administrado a un paciente ya padece una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o al menos detener parcialmente, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La efectividad de dichas composiciones depende de las afecciones. incluyendo, pero no limitado a, la severidad y curso de la enfermedad, trastorno o condición, terapia
10 previa, estado de salud del paciente y respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico tratante. Solo a modo de ejemplo, las cantidades terapéuticamente efectivas se pueden determinar mediante la experimentación de rutina, que incluye, entre otros, un ensayo clínico de aumento de la dosis.

15 **[0144]** El término "tioalcoxi", como se usa aquí, se refiere a grupos que contienen azufre alquilo unido a las moléculas a través de un átomo de oxígeno.

[0145] El término "punto de fusión térmico" o T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración nucleica) a la que 50% de las sondas complementarias a una diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio.

20 **[0146]** El término "grupo tóxico" o "grupo tóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que puede causar daños, molestias o la muerte. Los restos tóxicos incluyen, pero no se limitan a, NCA1, auristatina, agente de unión al surco menor del ADN, agente alquilante del surco menor del ADN, enedina, lexitropsina, duocarmicina, taxano, puromicina, dolastatina, maytansinoide, alcaloide vinca, AFP, MMAF, MMAE, AE, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina-10, echinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1, netropsina, podofilotoxina (p.ej. etopósido, tenipósido, etc.), baccatina y sus derivados, agentes anti-tubulina, criptofisina, combretastatina, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicinas, colcimida, estramustina, cernadotina, discodermolida, maitansina, eleuterobina, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, clorozotocina, mostaza de uracilo, clormetina, ifosfamida, clorambucilo, pipobromano, trietilenmelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, dacarbazina y temozolomida, itarabina, citosina arabinosida, fluorouracilo, floxuridina, ostentación de nogalotina, 6-mercaptopetina, pentostatina, 5-fluorouracilo, metotrexato, 10-propargilo-5,8-dideazafolato, ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico, leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, paclitaxel, docetaxel, deoxico-formicina, lapsomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina, brequinar, antibióticos (p. ej. antraciclina, entamicina, cefalotina, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina, rociromicina, furazolidona, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, flucloxacilina, meticilina, penicilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, oflaxacina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomina, refabutina, etambutol, rifaximina, etc.), medicamentos antivirales (p. ej., abacavir, aciclovir, amplígeno, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, inmunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazona, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, estavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, etc.), daunorubicina hidrocloreto, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarubicina, doxorubicina, epirubicina, derivados de morfolino, bisciclopéptidos de fenoxizina (p. ej., dactinomicina), glucopéptidos básicos (p. ej., bleomicina), glucósidos de antraquinona (p. ej., plicamicina, mitramicina), antracenediones (p. ej., mitoxantrona), indoleidonas de azirinopirrol (p. ej., mitomicina), inmunosupresores macrocíclicos (p. ej. ciclosporina, FK-506, tacrolimus, prograf, rapamicina, etc.), navelbeno, CPT-45 11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, alocolchicina, Halicondrina B, colchicina, derivados de colchicina, maitansina, rizoxina, paclitaxel, derivados de paclitaxel, docetaxel, tiocolchicina, cisterina de tritilo, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, cisplatino, carboplatino, hidroxurea, N-metilhidrazina, epidofilotoxina, procarbazona, mitoxantrona, leucovorina, y tegafur. "Taxanos" incluyen paclitaxel, así como cualquier derivado de taxano activo o pro-fármaco. Agentes quimioterapéuticos como erlotinib (TARCEVA.RTM., Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE.RTM., Millenium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX.RTM., AstraZeneca), sunitinib (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA.RTM., Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC.RTM., Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin.RTM., Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE.RTM., Wyeth), lapatinib (TYKERB.RTM., GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y gefitinib (IRAC), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugent), agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN.RTM. ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, impropulsulfán y piposulfán; antifolato antineoplásico como pemetrexed (ALIMTA.RTM. Eli Lilly), aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamina, trietilenotiofosforamina y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluido el topotecán análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-60 1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novemiquina, fenesterina, prednisona, trofosfamida, mostaza de uracil; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos enediino, caliqueamicina, caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omegal1; dinemina, incluyendo dinemina A;

bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos relacionados con cromoproteína enedina, aclacinomisinas, actinomicina, antramycin, azerasina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carcinicilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN.RTM. doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina and deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina diaziouona; elformitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK.RTM, complejo de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, Oregón); razoxano; rizoxina; sizofuran espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manacustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL.RTM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE.TM. libre de cremofor, albúmina, formulación en nanopartículas de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111), y TAXOTERE.RTM, doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; GEMZAR.RTM. gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y copoplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE.RTM. vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; retinoides como el ácido retinoico, capecitabina y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

[0147] Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento", como se usan en este documento, incluyen aliviar, o mejorar una enfermedad o los síntomas de la condición, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, p. ej., detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento", incluyen, entre otros, tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

[0148] Tal como se utiliza aquí, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. Polímeros solubles en tal agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, propionaldehído de polietilenglicol, mono C₁-C₁₀ alcoxi o derivados de ariloxi de los mismos (que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol de polivinilo, poliaminoácidos, anhídrido diviniléter maleico, N-(2-hidroxipropilo) metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, polipropileno oxido/copolímero de óxido de etileno, polioxiethylado polioli, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluidos, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, albúmina de suero, derivados de almidón y almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, polivinilo etilo éteres y alfa beta-poli[(2-hidroxietilo)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de los mismos. Solo a modo de ejemplo, el acoplamiento de dichos polímeros solubles en agua a polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos no naturales puede producir cambios que incluyen, entre otros, aumento de la solubilidad en agua, vida media en suero aumentada o modulada, vida media terapéutica aumentada o modulada relativa a la forma no modificada, biodisponibilidad aumentada, actividad biológica modulada, tiempo de circulación extendido, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas que incluyen, entre otras, agregación y formación de multímeros, enlace al receptor alterado, enlace alterado a una o más parejas de enlace y alteración de la dimerización del receptor o multimerización. Además, tales polímeros solubles en agua pueden o no tener su propia actividad biológica.

[0149] A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica.

[0150] Los compuestos, (incluyendo, pero no limitado a aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos modificados no naturales de aminoácidos, y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) presentados en el presente documento incluyen compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los enumerados en las diversas fórmulas y estructuras presentadas en este documento, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masas que se encuentra generalmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl, respectivamente. Ciertos compuestos

5 marcados con isótopos descritos en el presente documento, p. ej., aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución de tejido de sustrato y/o fármaco. Además, la sustitución con isótopos como el deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, p. ej., un aumento de la vida media *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos.

10 **[0151]** Algunos de los compuestos de este documento (que incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) tienen átomos de carbono asimétricos y, por tanto, pueden existir como enantiómeros o diastereómeros. Las mezclas diastereoméricas se pueden separar en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias químicas físicas por métodos conocidos, p. ej., por cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (p. ej., alcohol), separando los diastereoisómeros y convirtiendo (p. ej., hidrolizando) los diastereoisómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Todos estos isómeros, incluidos los diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos, se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.

20 **[0152]** En realizaciones adicionales o adicionales, los compuestos descritos en el presente documento (que incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) son utilizados en forma de profármacos. En realizaciones adicionales o adicionales, los compuestos descritos en el presente documento ((incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) se metabolizan en la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se usa para producir un efecto deseado, incluido un efecto terapéutico deseado. En otras formas de realización adicionales se encuentran los metabolitos activos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales "modificados o no modificados".

30 **[0153]** Los métodos y formulaciones descritas en el presente documento incluyen el uso de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos), o sales farmacéuticamente aceptables de los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados. En ciertas realizaciones, los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden existir como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en este documento. Además, los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en el presente documento también se consideran descritas en el presente documento.

45 **[0154]** Algunos de los compuestos en el presente documento (incluyendo, pero no limitado a los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para la producción de los compuestos mencionados anteriormente) pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en este documento. Además, p. ej., todas las formas enol-ceto de cualquier compuesto (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos y reactivos de aminoácidos no naturales modificados para producir los compuestos mencionados anteriormente) se consideran aquí como parte de las composiciones descritas en este documento.

50 **[0155]** Algunos de los compuestos de la presente memoria (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos y reactivos de aminoácidos no naturales modificados para producir cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente) son ácidos y puede formarse una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos de la presente memoria (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) pueden ser básicos y, en consecuencia, pueden formar una sal con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluidas las di-sales, están dentro del alcance de las composiciones descritas en el presente documento y pueden prepararse mediante métodos convencionales. P. ej., las sales pueden prepararse poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas, ya sea en forma acuosa, no acuosa o medio parcialmente acuoso. Las sales se recuperan utilizando al menos una de las siguientes técnicas: filtración, precipitación con un no disolvente seguido de filtración, evaporación del disolvente o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

65 **[0156]** Las sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento pueden ser formadas cuando un protón ácido presente en los polipéptidos de aminoácidos no naturales original se reemplaza por un ión metálico, a modo de ejemplo un ión de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion

de aluminio; o coordinadas con una base orgánica. Además, las formas de sal de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos pueden prepararse usando sales de los materiales de partida o intermedios. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable (que es un tipo de sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de base libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento con un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento pueden prepararse como sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables (que son un tipo de sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de ácido libre de polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento con una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable.

[0157] El tipo de sales farmacéuticamente aceptables, incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formado con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoilo)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metileno-bis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original, o bien se reemplaza por un ion metálico, p. ej., un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o coordinadas con una base orgánica. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio y similares.

[0158] Los contraiones correspondientes de las sales farmacéuticamente aceptables de polipéptido de aminoácidos no naturales pueden analizarse e identificarse usando varios métodos incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de iones, electroforesis capilar, plasma acoplado inductivamente, espectroscopia de absorción atómica, espectrometría de masas, o cualquier combinación de los mismos. Además, la actividad terapéutica de tales sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales se puede ensayar utilizando las técnicas y métodos descritos en los ejemplos 87-91.

[0159] Debe entenderse que una referencia a una sal incluye las formas de adición o formas cristalinas del mismo, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente, y a menudo se forman durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables, como agua, etanol y similares. Los hidratos se forman cuando el disolvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el disolvente es alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento de cristales de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos suelen tener diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores, como el disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden hacer que domine una forma de cristal único.

[0160] La detección y caracterización de sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales, polimorfos y/o solvatos se puede realizar usando una variedad de técnicas, incluyendo, pero no limitado a, análisis térmico, difracción de rayos x, espectroscopia, sorción de vapor, y microscopia. Los métodos de análisis térmico abordan la degradación termoquímica o los procesos termo físicos que incluyen, entre otros, transiciones polimórficas, y dichos métodos se utilizan para analizar las relaciones entre formas polimórficas, determinar la pérdida de peso, encontrar la temperatura de transición vítrea o para estudios de compatibilidad de excipientes. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, calorimetría diferencial de barrido (DSC), calorimetría diferencial de barrido modulada (MDCS), análisis termogravimétrico (TGA) y análisis termométrico e infrarrojo (TG/IR). Los métodos de difracción de rayos X incluyen, pero no se limitan a, difractómetros de cristal único y en polvo y fuentes de sincrotrón. Las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas incluyen, pero no se limitan a, Raman, FTIR, UVIS y RMN (estado líquido y sólido). Las diversas técnicas de microscopía incluyen, pero no se limitan a, microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis de rayos X de energía dispersiva (EDX), microscopía electrónica de barrido ambiental con EDX (en atmósfera de gas o vapor de agua), microscopia IR, y microscopia raman.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0161] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones anexas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que presenta las realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

FIGURA 1 presenta una ilustración gráfica de la eficacia antitumoral de ARX- α PSMA (10 mg/kg) y 1 mg/kg, 3 mg/kg, y 10 mg/kg de dosis del fármaco de anticuerpo conjugado ARX- α PSMA-NCA1 en el modelo de cáncer de próstata LNCaP. Una sola inyección de PSMA-(591VK)-HA116-NCA1 a 10,3,1 mg/kg contrajo tumores LNCaP (cáncer de próstata). El tipo salvaje (no conjugado) no tuvo efecto antitumoral.

FIGURA 2 presenta una ilustración gráfica del peso corporal en grupos de sujetos de prueba tratados por vía intravenosa con ARX- α PSMA (10 mg/kg) y 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg de dosis del anticuerpo conjugado ARX- α PSMA-NCA en el modelo de cáncer de próstata LNCaP.

FIGURA 3A presenta una ilustración gráfica de los resultados del ensayo de viabilidad celular LNCaP descrito en el Ejemplo 27.

FIGURA 3B presenta una ilustración gráfica de los resultados del ensayo de viabilidad celular MDA-PCa-2 descrito en el Ejemplo 27.

FIGURA 4 presenta una ilustración gráfica del ensayo de viabilidad celular PC-3 utilizado como control negativo en el Ejemplo 27.

FIGURA 5A presenta una ilustración gráfica de los resultados del ensayo de viabilidad celular LNCaP descrito en el Ejemplo 28.

FIGURA 5B presenta una ilustración gráfica de los resultados del ensayo de viabilidad celular MDA-PCa-2 descritos en el Ejemplo 28.

FIGURA 6 presenta una ilustración gráfica del ensayo de viabilidad celular PC-3 utilizado como control negativo en el Ejemplo 28.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0162] Si bien las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en este documento, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios, y sustituciones ahora se ocurrirán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para poner en práctica la invención. Las reivindicaciones anexas definen el alcance de la invención.

I. Introducción

[0163] Recientemente, se ha publicado una tecnología completamente nueva en las ciencias de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones de proteínas específicas del sitio. Específicamente, se han agregado nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas del procarionota *Escherichia coli* (*E. coli*) (p. ej., L. Wang, et al., (2001), *Science* 292: 498-500) y al eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (p. ej., J. Chin et al., *Science* 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas *in vivo*. Varios nuevos aminoácidos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, que incluyen etiquetas de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, ceto aminoácidos y aminoácidos glicosilados se han incorporado de manera eficiente y con alta fidelidad a proteínas en *E. coli* y en levaduras en respuesta al codón ámbar, TAG, utilizando esta metodología. Ver, p. ej., JW Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124: 9026-9027; JW Chin, y PG Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3 (11): 1135-1137; JW Chin, et al., (2002), *PNAS United States of America* 99 (17): 11020-; y, L. Wang, y PG Schultz, (2002), *Chem. Com.*, 1-11. Estos estudios han demostrado que es posible introducir selectiva y rutinariamente grupos funcionales químicos que no se encuentran en proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que pueden usarse para reaccionar de manera eficiente y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

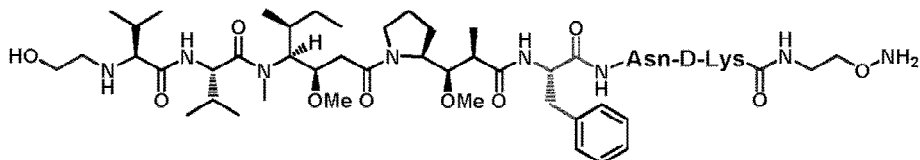
II. Visión general

[0164] La presente invención proporciona anticuerpos α PSMA que tienen un aminoácido no codificado de forma natural que facilitan la conjugación de anticuerpos a un fármaco (por ejemplo un fármaco, toxina, molécula marcadora). El ADC comprende un anticuerpo α PSMA conjugado a un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no encolado de forma natural en el anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo α PSMA conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena pesada del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo α PSMA conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena ligera del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena pesada del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena ligera del anticuerpo.

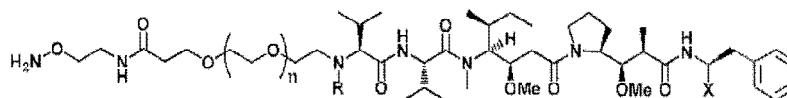
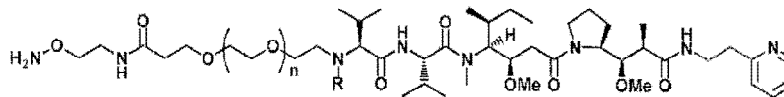
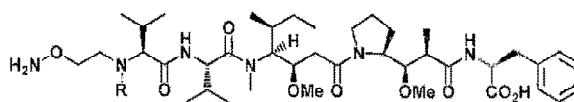
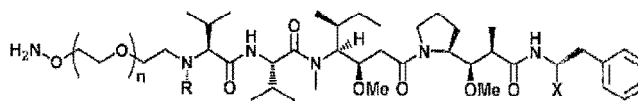
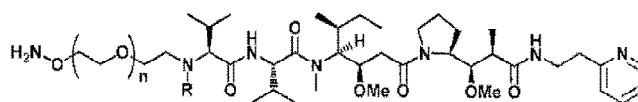
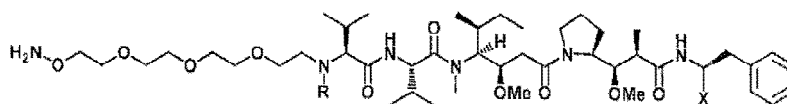
[0165] En algunas realizaciones, el fármaco de la ADC es un fármaco citotóxico. En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un agente de unión al surco

menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, un enedino, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puomicina, dolastatina, un maitansinoide y un alcaloide de la vinca. En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecan, morfolino-doxubulina, rizoxina, cianomorfolina, y/o Lastatin-10, equinomocina, combretatstatina, chaliceamicina, maitansina, DM-1, o netropsina.

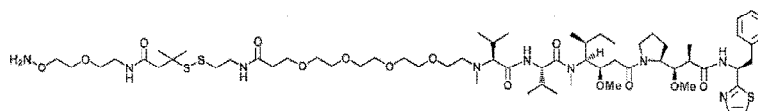
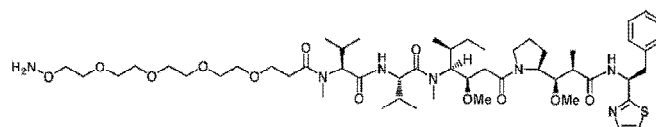
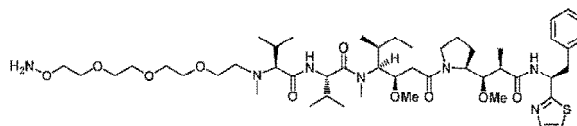
[0166] En algunas realizaciones de la presente invención, el fármaco citotóxico es



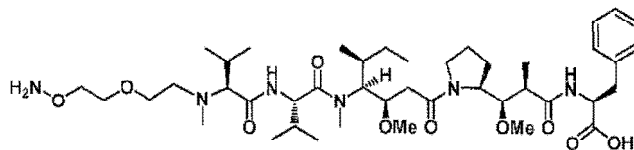
15 [0167] En otras realizaciones de la presente invención, el fármaco citotóxico se selecciona de entre el grupo que comprende:



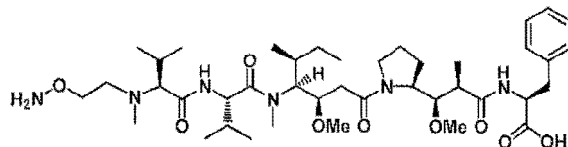
50 [0168] En algunas realizaciones de la presente invención, el fármaco citotóxico se elige del grupo que consiste en



5

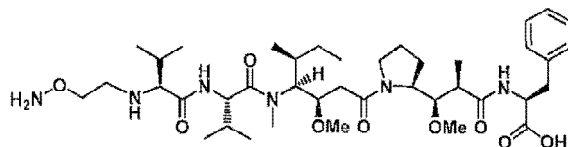


10



15

20



[0171] En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico es un agente anti-tubulina. En algunas realizaciones, el agente antitubulina es una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina o una dolastatina. En otros aspectos de la invención, el agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, do-cetaxel, epotilona A, nocodazol, colchicinas, colcimid, estramustina, cemadotina, discodennolide, maytanina, DM-1, o eleuterobina.

[0172] En otros aspectos de la invención, el fármaco citotóxico de la ADC es ganciclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo, el metotrexato, el cortisol, la aldosterona, dexametasona, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de la 5-ipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrienos.

[0173] En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo de la ADC comprende un anticuerpo de longitud completa que: (a) se une a PSMA, y (b) está conjugado a un agente citotóxico o un agente inmunosupresor, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce: (a) un efecto citotóxico o citostático en una línea celular cancerosa que expresa PSMA, o (b) un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor en una célula inmunitaria que expresa PSMA, en donde la conjugación se produce a un aminoácido naturalmente codificado en el anticuerpo.

[0174] A un nivel, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y utilizar derivados de enlazadores de dolastatina o análogos que comprenden al menos un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidracina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino o eno-diona. En otro nivel, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y utilizar derivados de enlazadores de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con una oxima, una amina aromática, un heterociclo (p. ej., indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.),

[0175] Tales derivados del enlazador de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye pero no se limita a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos, tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no pueden clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se superpone en el alcance con un derivado de polietilenglicol; sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0176] En este documento en algunas realizaciones, se proporciona un derivado de grupo enlazador tóxico que comprende un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino o eno-diona. En algunas realizaciones, el derivado de grupo tóxico comprende cualquiera de los enlazadores descritos en el presente documento. En otras realizaciones, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados de grupos tóxicos o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con una oxima, una amina aromática, un heterociclo (p. ej., indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0177] En algunas realizaciones, tales derivados tóxicos que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener además funcionalidad, incluyendo, pero no limitado a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el grupo tóxico es un inhibidor de tubulina. En ciertas realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o auristatina. En otras realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o derivado de auristatina. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas anteriormente no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se superpone en el alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0178] Ciertas realizaciones de la presente invención describen preparaciones de ciertos restos tóxicos con enlazadores que reducen la toxicidad del resto *in vivo* mientras que el resto tóxico conserva la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, la toxicidad del grupo tóxico unido, cuando se administra a un animal o humano, se reduce o elimina en comparación con el grupo tóxico libre o los derivados de grupos tóxicos que comprenden enlaces lábiles, al tiempo que conservan la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, dosis aumentadas del grupo tóxico enlazado (p. ej., derivados del enlazador de dolastatina, derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales) pueden administrarse a animales o humanos con mayor seguridad. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a un resto tóxico (p. ej., derivado de dolastatina) proporcionan estabilidad *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a un resto tóxico (p. ej., inhibidor de tubulina, derivado de dolastatina-10) son eficaces y menos tóxicos en comparación con el resto tóxico libre (p. ej., inhibidor de tubulina, dolastatina-10).

III. Derivados del enlazador de dolastatina

[0179] A un nivel, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y utilizar un derivado de enlazador de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un carbonilo, dicarbonilo, oxima o grupo hidroxilamina. Dichos derivados del enlazador de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye, entre otros, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas anteriormente no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se superpone en el alcance con un derivado de polietilenglicol; sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0180] En un aspecto hay métodos para seleccionar y diseñar un derivado de enlazador de dolastatina a modificar usando los métodos, composiciones y técnicas descritas en el presente documento. El nuevo derivado de enlazador de dolastatina se puede diseñar de novo, incluyendo solo a modo de ejemplo, como parte de proceso de selección de alto rendimiento (en cuyo caso se pueden diseñar, sintetizar, caracterizar y/o ensayar numerosos polipéptidos) o basarse en los intereses del investigador. El nuevo derivado del enlazador de dolastatina también puede diseñarse en base a la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. Sólo a modo de ejemplo, la dolastatina ha sido objeto de un intenso estudio por parte de la comunidad científica; se puede diseñar un nuevo compuesto basado en la estructura de la dolastatina. Los principios para seleccionar qué aminoácidos se han de sustituir y/o modificar se describen por separado en el presente documento. La elección de la modificación a emplear también se describe en el presente documento, y se puede utilizar para satisfacer las necesidades del experimentador o usuario final. Dichas necesidades pueden incluir, entre otras, la manipulación de la eficacia terapéutica del polipéptido, la mejora del perfil de seguridad del polipéptido, el ajuste de la farmacocinética, la farmacología y/o la farmacodinámica del polipéptido, p. ej., únicamente a modo de ejemplo, aumentando la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, aumentando la vida media en suero, aumentando la vida media terapéutica, modulando la inmunogenicidad, modulando la actividad biológica, o extendiendo el tiempo de circulación. Además, dichas modificaciones incluyen, solo a modo de ejemplo, proporcionar una funcionalidad adicional al polipéptido, incorporando un anticuerpo y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas anteriormente.

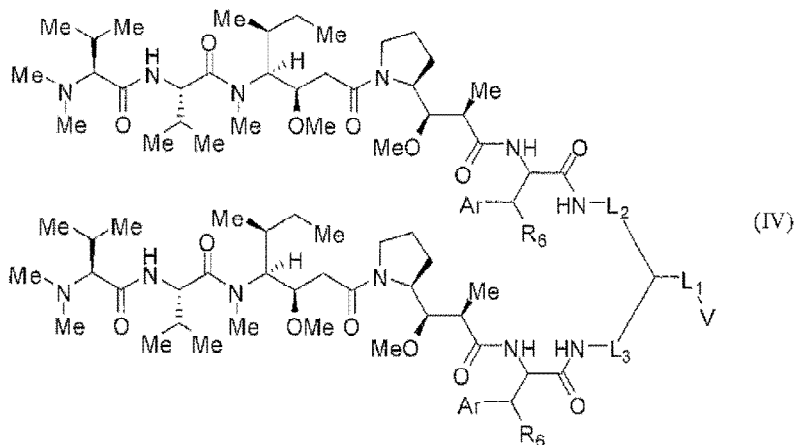
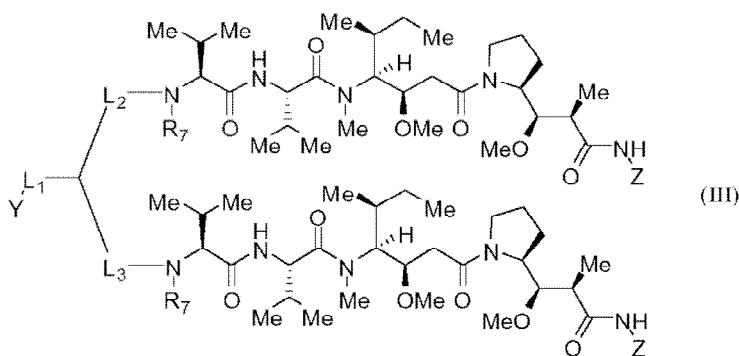
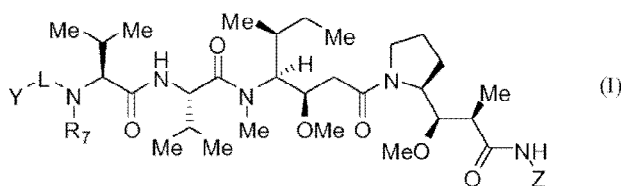
[0181] También se describe en la presente memoria derivados de enlazadores de dolastatina que tienen o se pueden modificar para contener una oxima, carbonilo, dicarbonilo, o grupo de hidroxilamina. Con este aspecto se incluyen métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos derivados del enlazador de dolastatina.

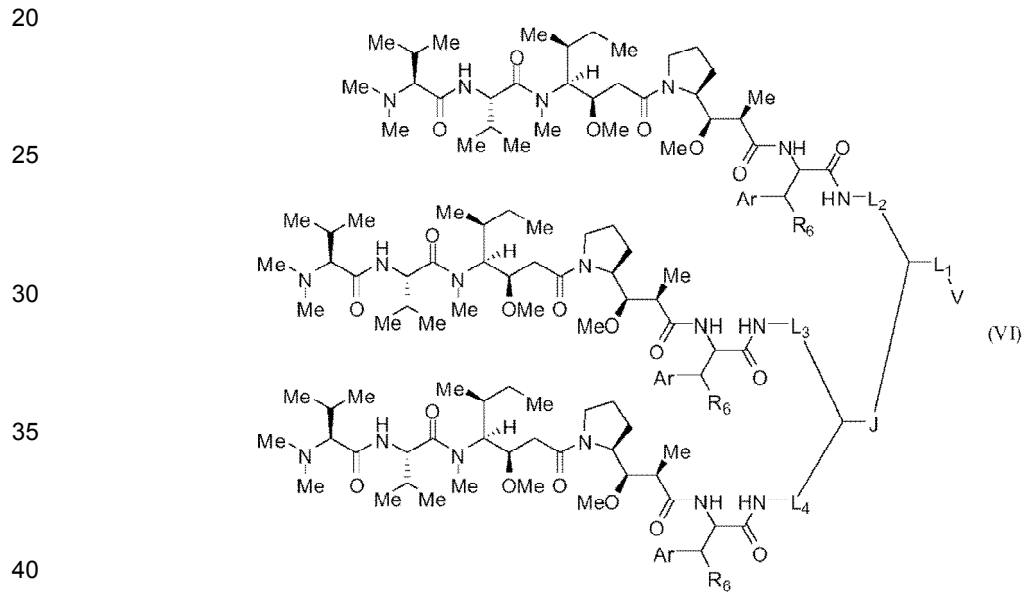
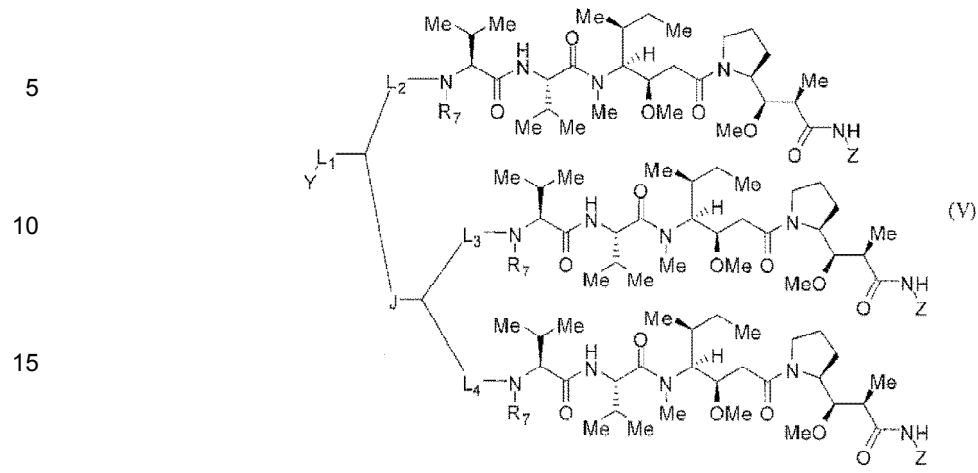
[0182] El derivado del enlazador de dolastatina puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o diez o más de un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, grupo hidroxilamina o formas protegidas de los mismos. El derivado del enlazador de dolastatina puede ser igual o diferente, p. ej., puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en el derivado que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más grupos reactivos diferentes.

A. Estructura y síntesis de los derivados del enlazador de dolastatina: grupos electrófilos y nucleófilos

[0183] Derivados de dolastatina con enlazadores que contienen un grupo de hidroxilamina (también llamado un aminooxi) permiten la reacción con una variedad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo pero no limitado a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidracinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxi permite que se reaccione de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen grupos carbonilo o dicarbonilo, que incluyen, entre otros, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Ver, p. ej., Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893 - 3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, AcC. Chem. Res. 34 (9): 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, una oxima resulta generalmente de la reacción de un grupo 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. En algunas realizaciones, los derivados de la dolastatina con enlazadores que comprenden una azida, un alquino o un cicloalquino permiten la unión de moléculas mediante reacciones de cicloadición (p. ej., cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición Huisgen de azidaalquino, etc.). (Descrito en la Patente de Estados Unidos N° 7.807.619).

[0184] Por lo tanto, en ciertas descripciones descritas en este documento, se encuentran derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, cetoamina, ceto-alquino, y el grupo eno-diona hidroxilamina, un grupo similar a la hidroxilamina (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo hidroxilamina), o grupo hidroxilamina protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina tras la desprotección). En algunas descripciones, los derivados de dolastatina con enlazadores comprenden azidas, alquinos o cicloalquinos. La presente invención proporciona derivados de enlazadores de dolastatina que incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI):





en donde:

45 Z tiene la estructura de:



55 R₅ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆, o tiazol;
R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;

60 R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
Y y V son NH₂-O-;

65 L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquileo-, -alquileo-C(O)-, alquileo-J-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-J-, -(alquileo-O)_n-J-alquileo-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J', -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-

realizaciones, los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son independientemente un enlazador escindible o enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un oligo (etilenglicol) enlazador derivado.

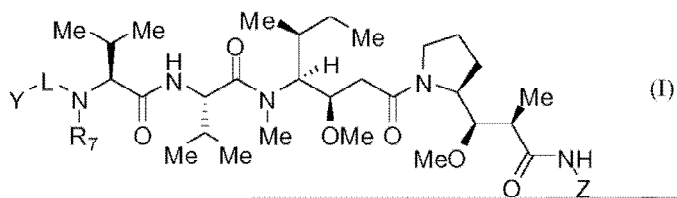
5 **[0192]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo", y alquileo" independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas
10 realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada N, n', n", n'" y n"" es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

15

B. Estructura y síntesis de los derivados del enlazador de dolastatina: grupos hidroxilamina

[0193] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas en este documento se encuentran derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden un grupo hidroxilamina. Tales derivados del enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I):

20

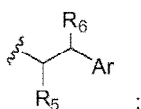


30

en donde:

Z tiene la estructura de:

35



40

R₅ es H, COR₈, C₁-C₆ alquilo, o tiazol;
R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;

45

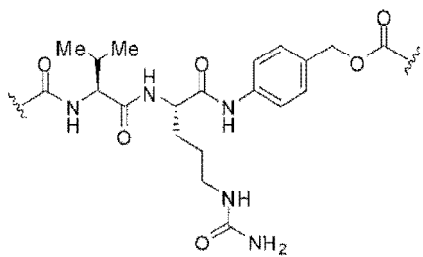
R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
Y es NH₂-O-;

50

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en-alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(O alquileo)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-;

W tiene la estructura de:

55



60

65

U tiene la estructura de:

realizaciones de compuestos de Fórmula (II), L es $-(\text{alquileo-O})_n(\text{CH}_2)_n\text{-NHC(O)-(CH}_2)_{n'}\text{-C(Me)}_2\text{-S-S-(CH}_2)_{n''}\text{-NHC(O)-(alquileo-O)}_{n'''}\text{-alquileo-}$. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada alquileo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n es igual a 1, n' es igual a 2, n'' es igual a 1, n''' es igual a 2, n'''' es igual a 4, y R₇ es metilo. Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

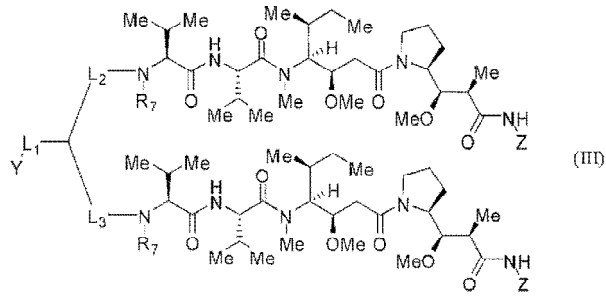
[0203] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada L es independientemente un enlazador escindible o enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada L es independientemente un enlazador derivado de oligo(etilenglicol).

[0204] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R₇ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo iso-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R₇ es hidrógeno.

[0205] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), alquileo es $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada n, n', n'', n''' y n'''' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

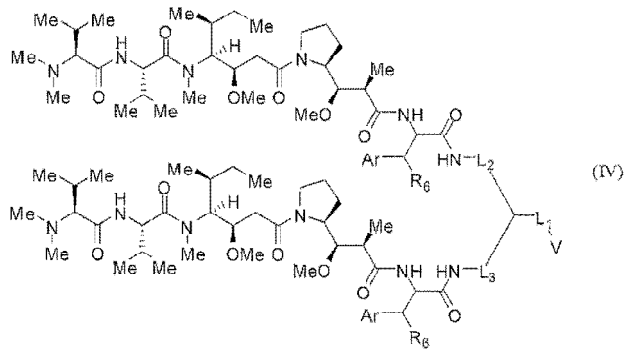
[0206] Tales derivados del enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI):

5



10

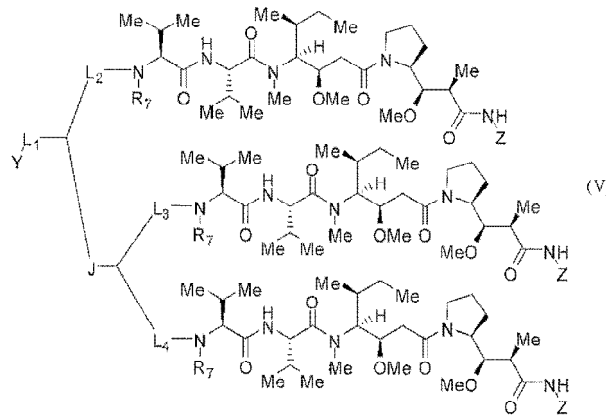
15



20

25

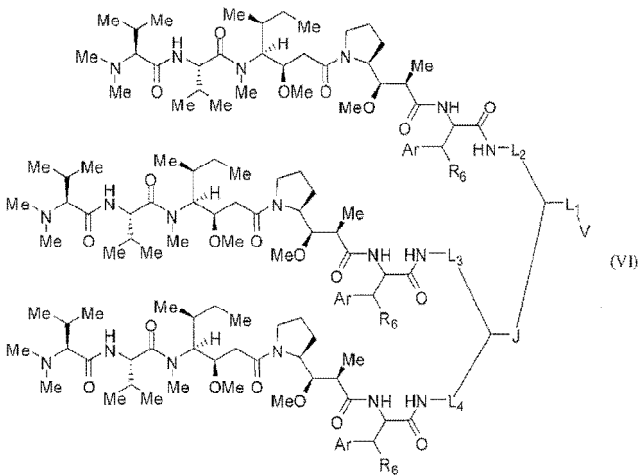
30



35

40

45



50

55

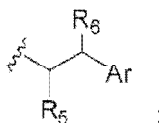
60

en donde:

Z tiene la estructura de:

65

5



10

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

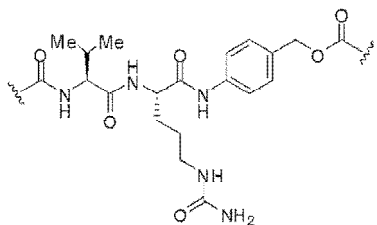
15

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y es NH₂-O-;
 V es -O-NH₂

20

L₁, L₂, L₃, y L₄ son cada uno ligadores selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquilenos-, -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-, -alquilenos'-J-(alquilenos-O)_n-alquilenos-, -J-(alquilenos-O)_n-alquilenos-, -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-(alquilenos-O)_n-alquilenos'-J-', -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-alquilenos'-, -W-, -alquilenos'-W-, alquilenos'-J-(alquilenos-NMe)_n-alquilenos'-W-, -J-(alquilenos-NMe)_n-alquilenos'-W-, -J-alquilenos'-NMe-alquilenos'-NMe-alquilenos'-W-, y alquilenos'-J-alquilenos'-NMe-alquilenos'-NMe-alquilenos'-W-; W tiene la estructura de:

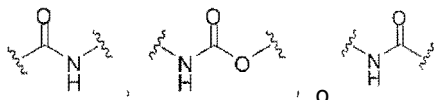
25



30

cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

35



40

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

45

[0207] Tales derivados de enlazadores dolastatina pueden estar en la forma de una sal, o pueden ser incorporados en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente se modifica traduccionalmente.

50

[0208] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), Ar es fenilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 20. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 10. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 5,

55

[0209] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es -NH-(alquilenos-O)_n-NH₂, en el que alquilenos es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es -NH-(alquilenos-O)_n-NH₂, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

65

[0210] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₆ es H. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₆ es hidroxilo.

[0211] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), Ar es fenilo.

[0212] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es hidrógeno.

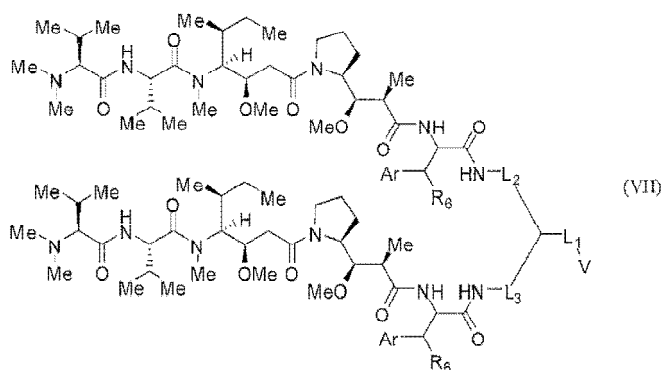
[0213] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), Y es hidroxilamina. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (IV) y (VI), V es de hidroxilamina.

[0214] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador escindible o un enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador derivado de oligo(etilenglicol).

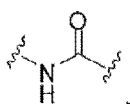
[0215] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo" y alquileo''' independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), el alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0216] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada n y n' independientemente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100.

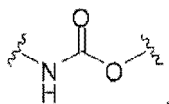
[0217] En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



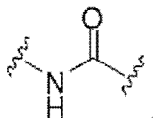
[0218] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VII), L₁ es -(alquileo-O)-alquileo-J-, L₂ es -alquileo'-J''-(alquileo-O)^{n'}-alquileo-, L₃ es -J'''-(alquileo-O)^{n''}-alquileo-, alquileo es -CH₂CH₂-, alquileo' es -(CH₂)₄-, n es 1, n' y n'' son 3 y J, tiene la estructura de



J' y J'' tienen la estructura de



y R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VII), L₁ es -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, L₂ es -(alquileo-O)_n-alquileo-J'-alquileo'-, L₃ es -(alquileo-O)_n-alquileo-J'', alquileo es -CH₂CH₂-, alquileo' es -(CH₂)₄-, n es 1, n' y n'' son 4, y J, J' y J'' tienen la estructura de



Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0219] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I)-(VII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I)-(VII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I)-(VII) es estable durante al menos 5 días bajo condiciones suavemente ácidas, en ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

[0220] Los métodos y composiciones proporcionados y descritos en este documento incluyen polipéptidos que comprenden derivado de enlazador dolastatina contiene al menos un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, un grupo hidroxilamina, o formas protegidas o enmascaradas de los mismos. La introducción de al menos un grupo reactivo en un derivado de enlazador de dolastatina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que involucren reacciones químicas específicas, que incluyen, entre otros, uno o más derivados de enlazador de dolastatina sin reaccionar con los que ocurren comúnmente aminoácidos. Una vez incorporadas, las cadenas laterales derivadas del enlazador de dolastatina también pueden modificarse utilizando las metodologías químicas descritas en el presente documento o adecuadas para los grupos funcionales o sustituyentes particulares presentes en el derivado del enlazador de dolastatina.

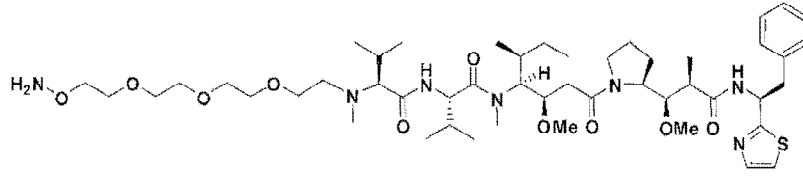
[0221] Los métodos de dolastatina enlazadores derivados y composiciones descritas en la presente memoria proporcionan conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, con otras sustancias que incluyen pero no están limitadas a un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos.

[0222] En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina, los enlazadores y los reactivos descritos en el presente documento, incluidos los compuestos de Fórmulas (I)-(VII) son estables en solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas (incluidos, entre otros, pH 2 a 8). En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos un mes en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas.

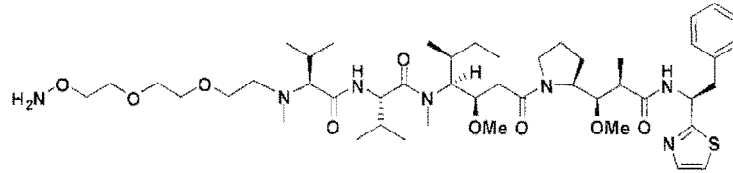
[0223] En otro aspecto de las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritas en el presente documento son métodos para estudiar o usar cualquiera de los derivados del enlazador de dolastatina de aminoácidos no naturales "modificados o no modificados" mencionados anteriormente. Se incluyen en este aspecto, solo a modo de ejemplo, los usos terapéuticos, de diagnóstico, basados en ensayos, industriales, cosméticos, de biología vegetal, ambientales, de producción de energía, de consumo y/o militares que se beneficiarían de un derivado del enlazador de dolastatina que comprende un polipéptido o proteína de aminoácido no natural "modificado o no modificado".

[0224] Los ejemplos no limitantes de derivados de dolastatina enlazadores incluyen:

5

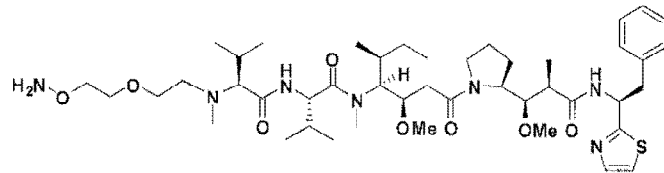


10



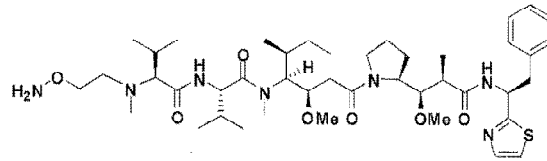
15

20

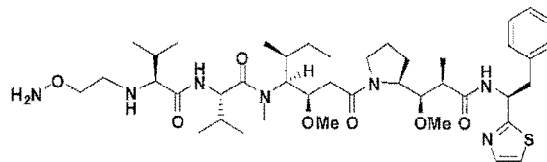


25

30

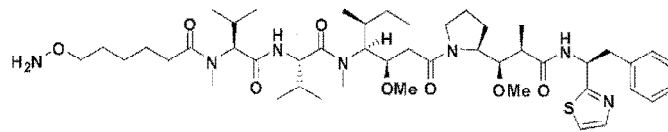


35

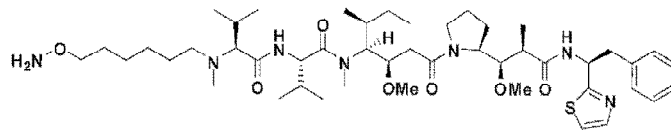


40

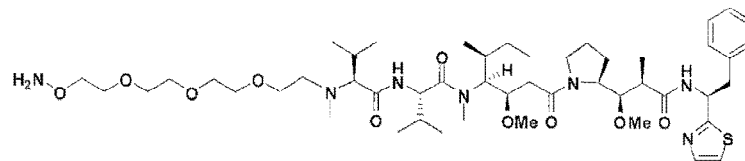
45



50

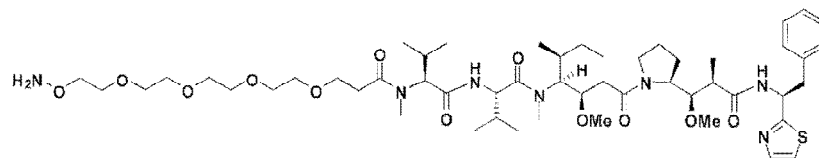


55

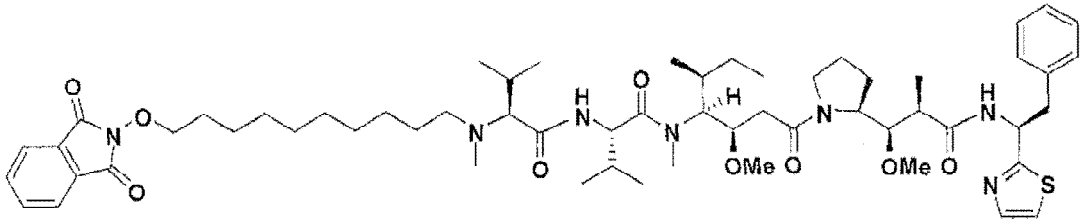


60

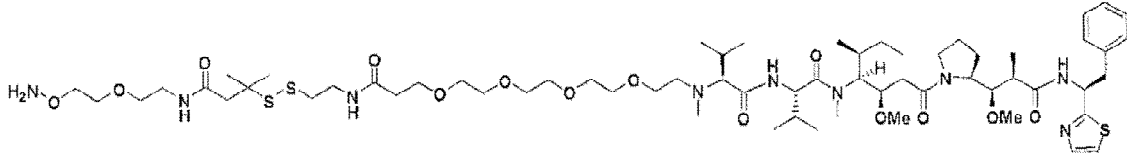
65



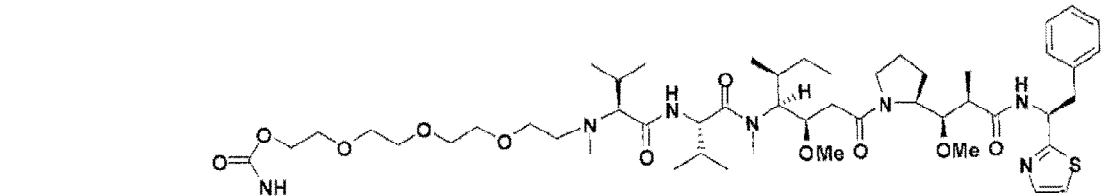
5



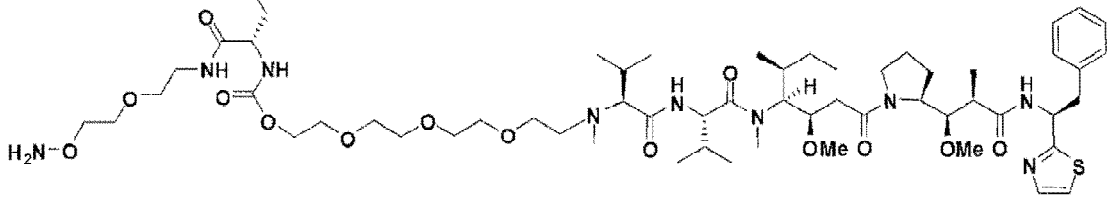
10



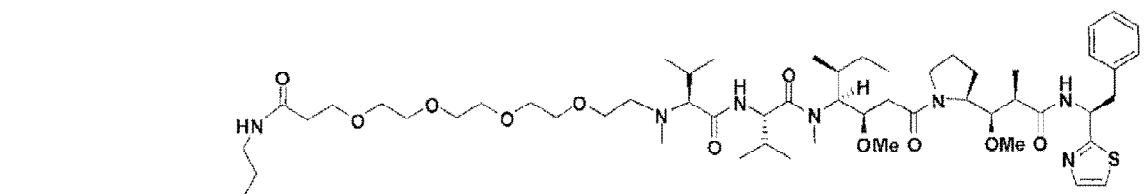
20



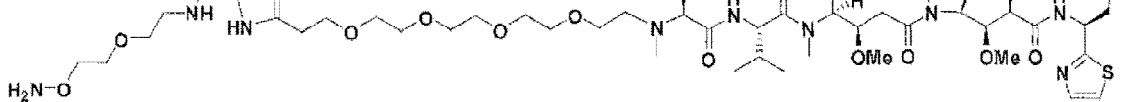
30



40



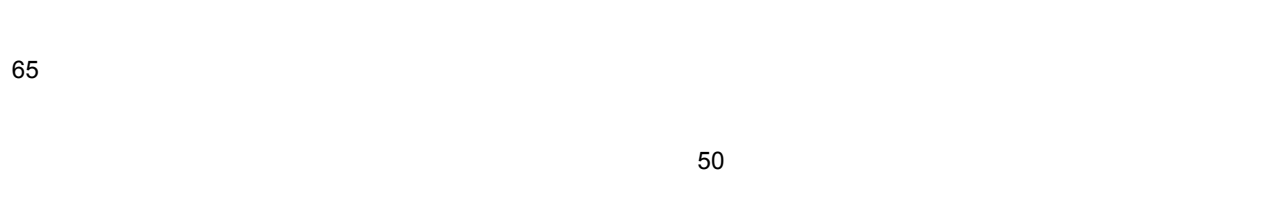
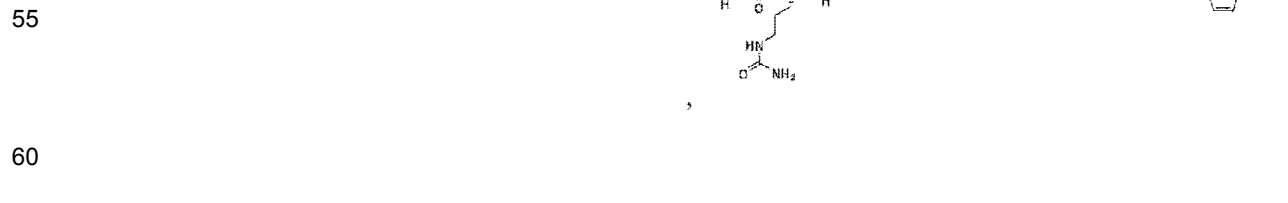
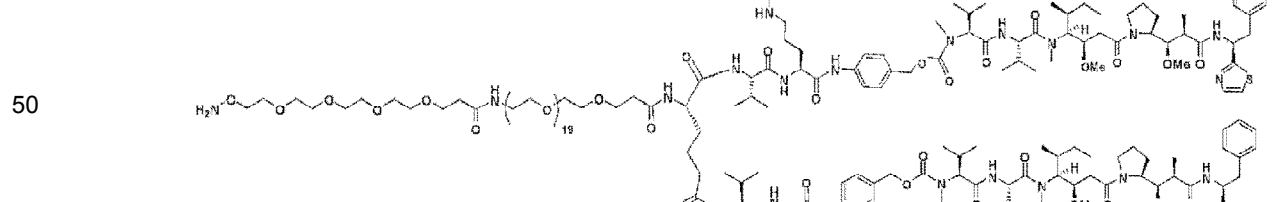
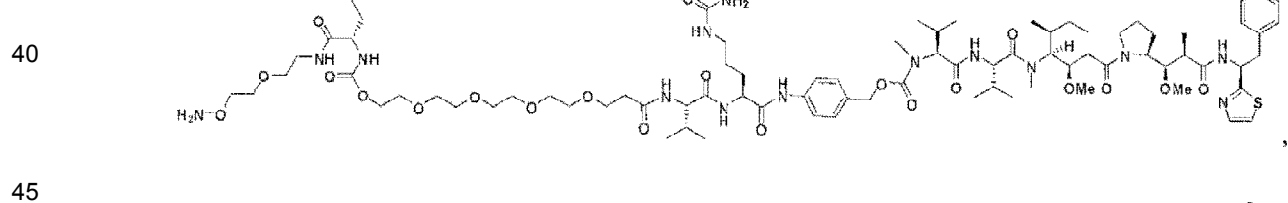
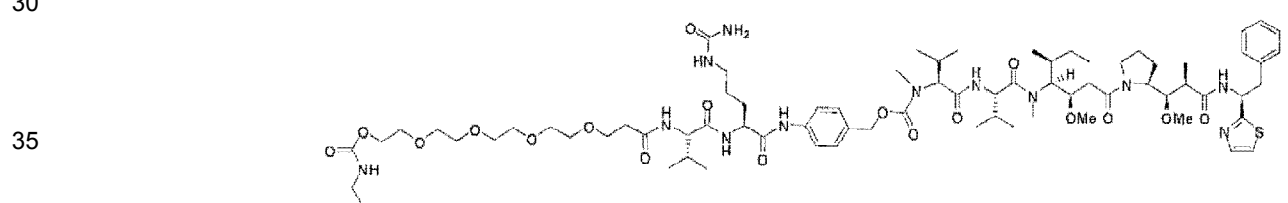
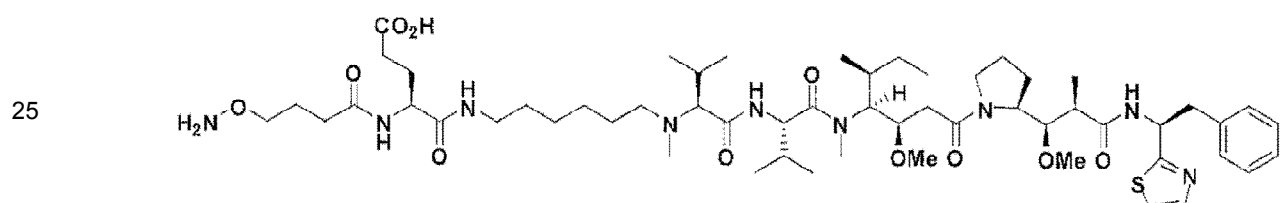
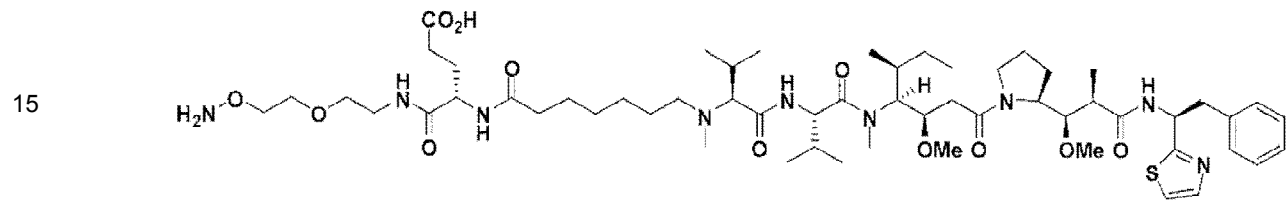
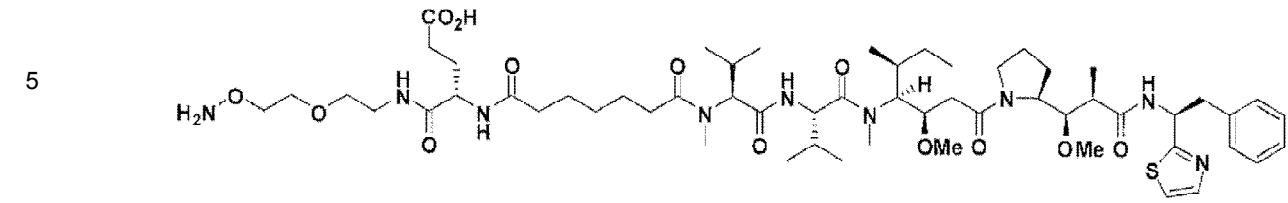
50

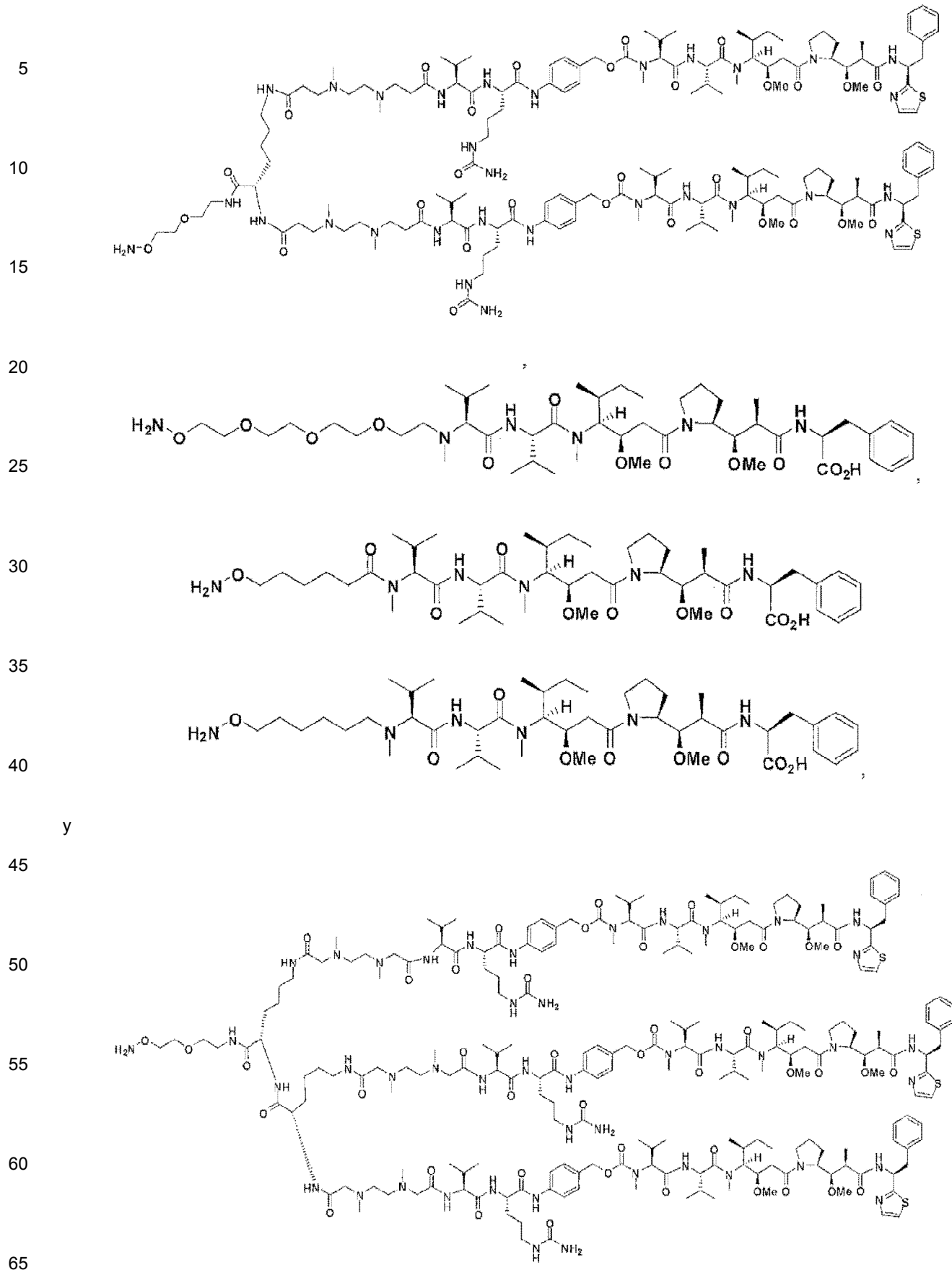


55

60

65





IV. Derivados de aminoácidos no naturales

[0225] Los aminoácidos no naturales usados en los métodos y composiciones descritos en el presente documento tienen por lo menos una de las cuatro propiedades siguientes: (1) al menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural tiene al menos una característica y/o actividad y/o reactividad ortogonales 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 ortogonales a la reactividad química de los aminoácidos naturales presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes químicamente hacia los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de manera estable en un polipéptido, preferiblemente con la estabilidad proporcional a los aminoácidos naturales o en condiciones fisiológicas típicas, y más preferiblemente dicha incorporación puede ocurrir a través de un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima al reaccionar con un reactivo, preferiblemente 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 propósito de la modificación/transformación), o donde la transformación pueda ocurrir en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o donde el sitio reactivo en el aminoácido no natural es un sitio electrofílico. Se puede introducir cualquier número de aminoácidos no naturales en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima después de la desprotección del grupo protegido o 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 enmascaramiento del grupo enmascarado y, por lo tanto, están disponibles para reaccionar con las hidroxilaminas u oximas para formar grupos de oximas.

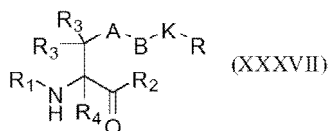
[0226] Los aminoácidos no naturales que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos glucosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos que se pueden dividir químicamente y/o aminoácidos foto-liberables, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales, incluidos, entre otros, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluidos, entre otros, mayores de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcares enlazados, aminoácidos activos redox, tioácidos amino que contienen aminoácidos y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

[0227] En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales comprenden un resto sacárido. Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-galactosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-treonina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-asparagina y *O*-manosaminilo-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N o O que se produce naturalmente entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en la naturaleza, incluidos, entre otros, un alqueno, un oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en proteínas tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

[0228] Los restos químicos incorporados en polipéptidos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales en tales polipéptidos ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de polipéptidos. P. ej., la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (incluido un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vivo* e *in vitro*. Un aminoácido no natural de átomo pesado, p. ej., puede ser útil para la eliminación de datos de estructura de rayos X. La introducción específica al sitio de átomos pesados que utilizan aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de posiciones para átomos pesados. Aminoácidos fotorreactivos no naturales (incluidos, entre otros, aminoácidos con benzofenona y arilazidas (incluidas, entre otras, cadenas laterales de fenilazida)), p. ej., permiten un eficaz fotointracción *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos fotorreactivos no naturales incluyen, pero no se limitan a, *p*-azido-fenilalanina y *p*-benzoilo-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede entonces reticularse a voluntad mediante la excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo no limitativo, el grupo metilo de un amino no natural se puede sustituir con un marcador isotópico, que incluye pero no se limita a, con un grupo metilo, como una sonda de estructura y dinámica local, que incluye pero no se limita a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

A. Estructura y síntesis de los derivados de aminoácidos no naturales: carbonilo, similar a carbonilo, carbonilo enmascarado y grupos de carbonilo protegido.

[0229] Los aminoácidos con un grupo reactivo electrofílico permiten una variedad de reacciones para unir moléculas a través de diversas reacciones químicas, incluyendo, pero sin limitarse a reacciones de adición nucleófilas, tales grupos reactivos electrofílicos incluyen un grupo carbonilo o dicarbonilo (incluyendo un grupo ceto o aldehído), un grupo similar a carbonilo o dicarbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo), un grupo de carbonilo enmascarado o de dicarbonilo enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo carbonilo o dicarbonilo), o un grupo carbonilo protegido o dicarbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo en caso de desprotección). Tales aminoácidos usados en la invención incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):

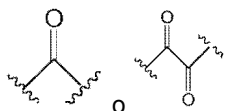


en donde:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquilileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno 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')=NN(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

K es



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

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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena de calor de la SEQ ID NO. 9;

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

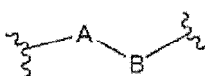
o el grupo -K-R forma un cicloalquilo monocíclico o bicíclico o heterocicloalquilo que comprende al menos un grupo carbonilo, incluido un grupo carbonilo, grupo carbonilo protegido, incluido un grupo dicarbonilo protegido, o grupo carbonilo enmascarado, incluido un grupo dicarbonilo enmascarado,

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 aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificados post-traduccionalmente.

[0230] En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (XXXVII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (XXXVII) es estable durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8.

[0231] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)(alquileo o alquileo sustituido)-, o -S(O)₂ (alquileo o alquileo sustituido)-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es -O(CH₂)-, -CH=N-, -CH=N-NH-, -NHCH₂-, -NHCO-, -C(O)-, -C(O)-(CH₂)-, -CONH-(CH₂)-, -SCH₂-, -S(=O)CH₂-, o -S(O)₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R es alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₁ es H, terc-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, acetilo tetrafluoro-(TFA), o benciloxicarbonilo (Cbz). En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo, o polinucleótido, En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo, o O-*t*-butilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo, o polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es un polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es ácido ribonucleico (RNA).

[0232] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII),



se selecciona del grupo que consiste en: (I)

(i)

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

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

(ii)

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

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

(iii)

A es alquileo inferior;

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

(iv)

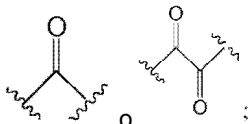
A es fenileno;

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

N(R')-;

K es

5



10

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

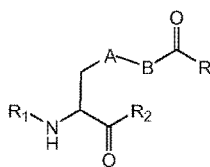
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; y

15 cada R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

[0233] Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVIII):

20



25

(XXXVIII),

en donde:

30

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

35

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=, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

40

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

45

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

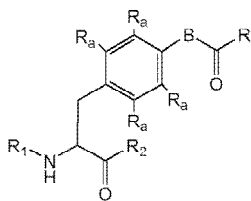
en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

con la condición de que 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 aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

50

[0234] Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXIX):

55



60

(XXXIX),

B es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-,

65

-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;

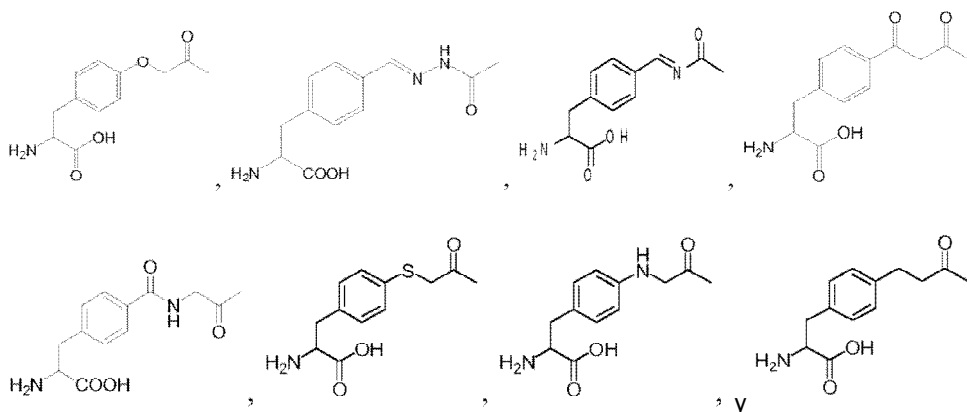
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

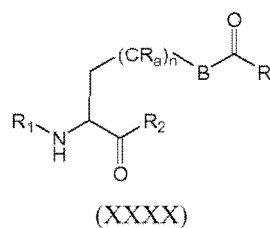
cada R un se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_kR' donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en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

[0235] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



[0236] Dichos aminoácidos no naturales pueden ser opcionalmente un grupo amino-prottegido, carboxilo protegido y/o en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificarse post-traduccionalmente.

[0237] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXX):



en donde

-NS(O)₂-, -OS(O)₂-, opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquileo inferior, alquileo 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;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

cada R un 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,

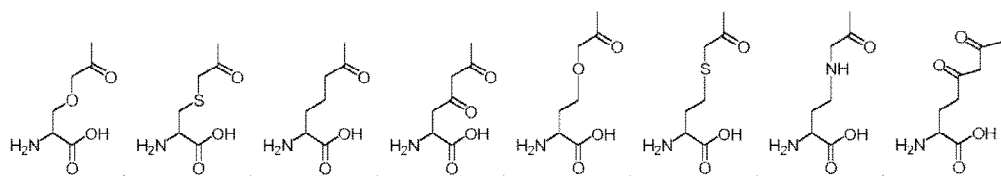
alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8;

con la condición de que cuando A es $-(CH_2)_4-$, B no es $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificados post-traduccionamente.

5

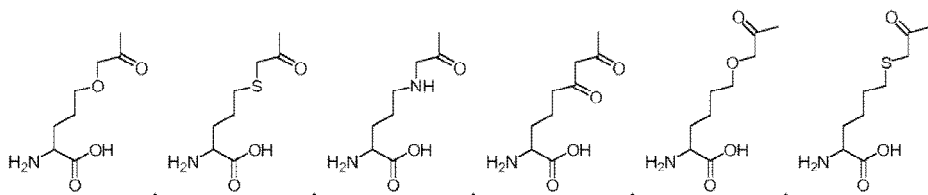
[0238] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

10



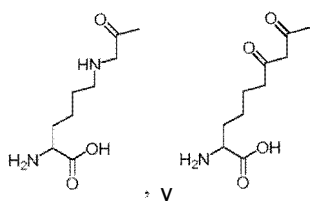
15

20



25

30

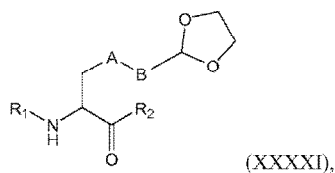


35

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

[0239] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXI):

40



45

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

50

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;

55

60

R_1 es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

[0240] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar

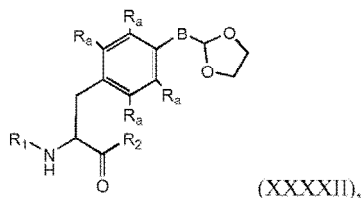
65

posteriormente.

[0241] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXII): en donde,

5

10



15

20

25

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquilenilo 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 amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; en el que cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

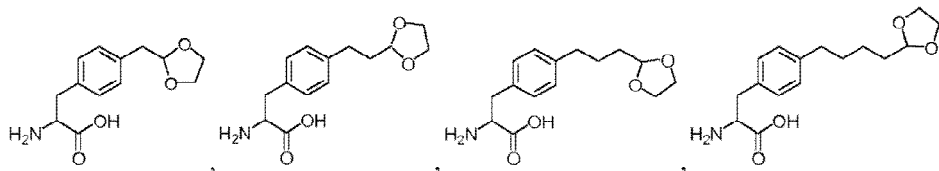
30

[0242] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

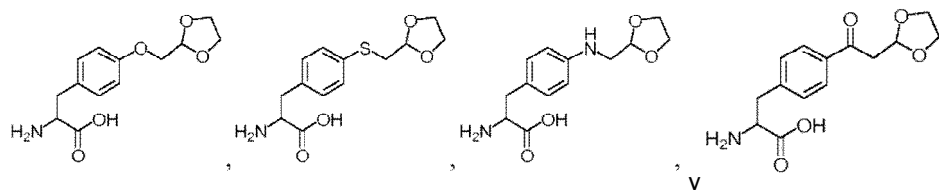
35

[0243] Además, se describen los siguientes aminoácidos:

40



45



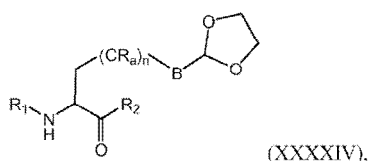
50

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

55

[0244] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIV):

60



65

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

alquileo inferior sustituido, alquileo inferior, alquileo 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;

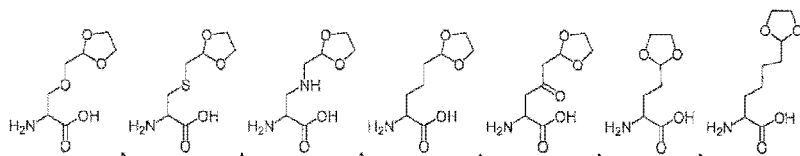
R¹ es H, un grupo amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

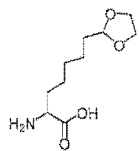
cada R^a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_kR' donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8,

[0245] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse a un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0246] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



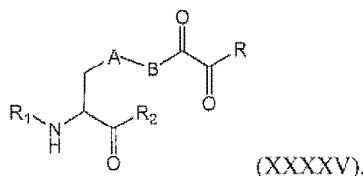
y



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

[0247] Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos aquí pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y dicarbonilo protegido.

[0248] P. ej., los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXV) están incluidos:



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

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

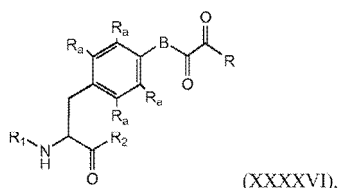
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9.

[0249] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

[0250] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVI):



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;

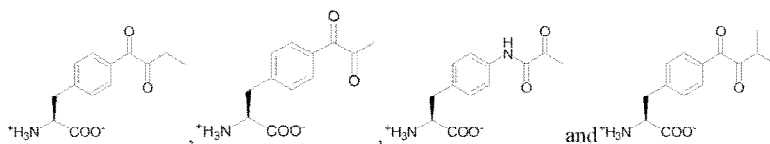
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

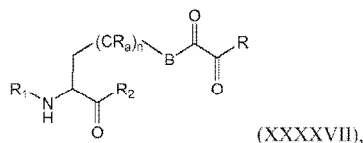
en la que cada R^a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR' y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificados post-traduccionalmente.

[0251] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



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

[0252] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVII): 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;

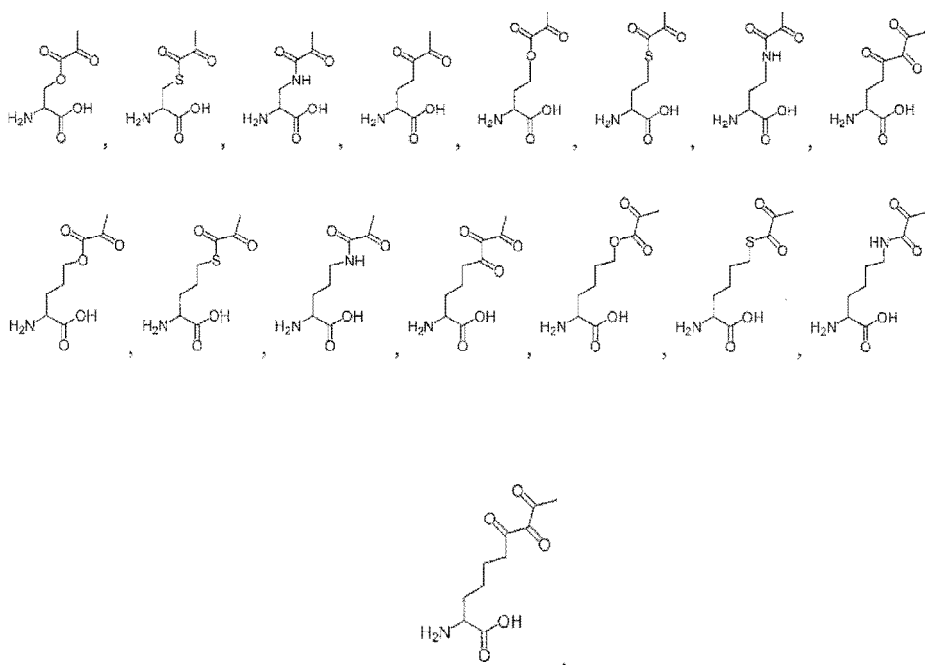
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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.

[0253] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

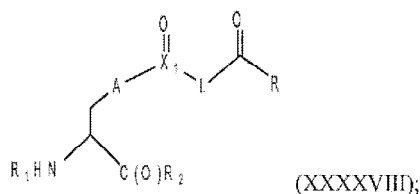
[0254] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



y

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

[0255] Además, los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVIII) se incluyen: en donde:



A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno sustituido, arileno, arileno sustituido, heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

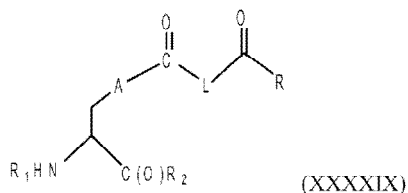
en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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.

5 **[0256]** Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

[0257] Además, los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIX) se incluyen: en la que:

10



15

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

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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

20

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

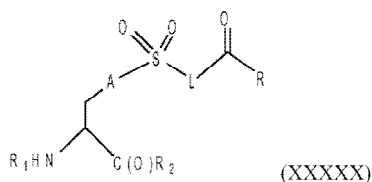
L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

25

30 **[0258]** Tales aminoácidos no naturales pueden ser en forma de una sal, o se pueden incorporar en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente después de la traducción modificada.

[0259] Además, los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXX) se incluyen: en donde:

35



40

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

45

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

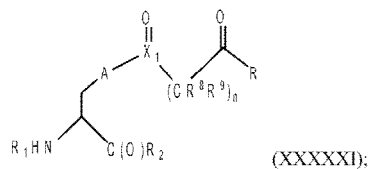
50

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

55 **[0260]** Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0261] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXI): en donde:

60



65

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

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

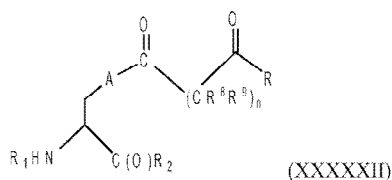
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

X1 es C, S, o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ 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.

[0262] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0263] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXII):



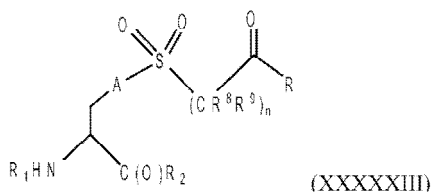
A es opcional y, cuando está presente, es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, heterocicloalquileo inferior,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

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

[0264] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0265] Además, los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIII) se incluyen: en la que:



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

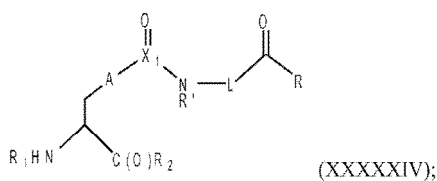
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

[0266] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0267] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIV):

5



10

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

15

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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

20

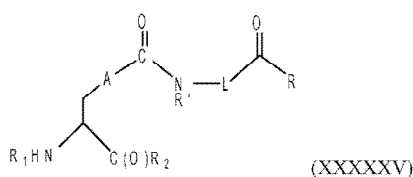
X₁ es C, S, o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

[0268] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

25

[0269] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXV):

30



35

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

40

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

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

45

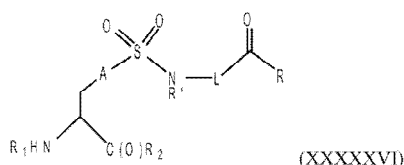
L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

[0270] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

50

[0271] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVI):

55



60 en donde:

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

65

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

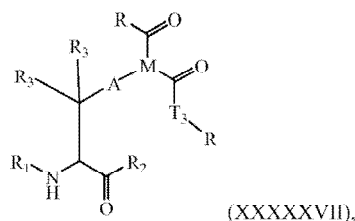
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

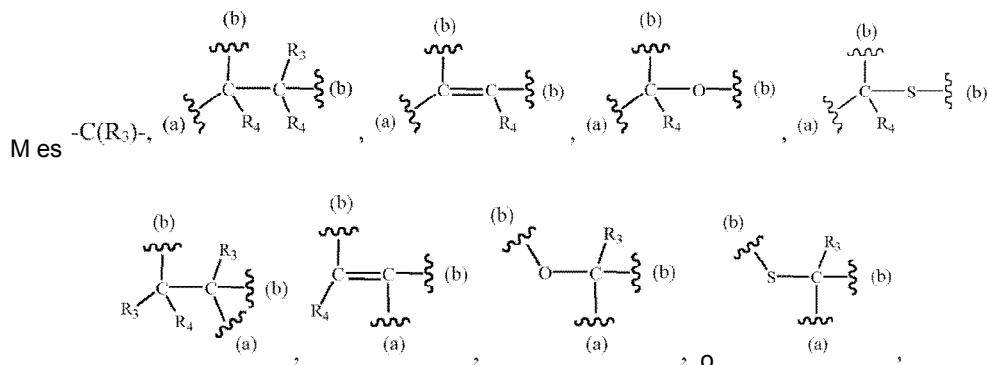
L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

[0272] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0273] Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVII):



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



donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ se eligen 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 amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

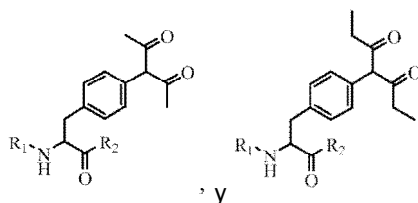
R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

[0274] Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

[0275] Además, se describen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVIII):

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

[0280] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de Fórmula (XXXXXX):



15 **[0281]** Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado post-traduccionalmente.

20 **[0282]** La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo puede hacerse reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones suaves en disolución acuosa para formar el enlace oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Ver, p. ej., Jencks, WP, J. Am. Chem. Soc. 81, 475 - 481 (1959); Shao, J. y Tam, JP, J. Am. Chem. Soc. 117 (14): 3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las otras cadenas laterales de aminoácidos. Ver, p. ej., Cornish, VW, et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, KF & Stroh, JG, Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, LK, et al., Science 276: 1125-1128 (1997).

25 **[0283]** La síntesis de p-acetilo-(+/-)-fenilalanina y m-acetilo-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., y otros, Biochemistry 42: 6,735-6746 (2003). Se pueden preparar de forma similar otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

30 **[0284]** En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional reactivo carbonilo o dicarbonilo. P. ej., una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación puede generarse a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, p. ej., se puede usar una serina N-terminal o treonina (que puede estar normalmente presente o expuesta mediante digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suave usando periodato. Ver, p. ej., Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. y Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner y otros, J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica están restringidos al aminoácido en el extremo N del péptido o proteína.

40 **[0285]** Además, a modo de ejemplo un aminoácido no natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes pueden ser incorporados en un polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarado". P. ej., la 5-hidroxilisina contiene un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implican la adición de un exceso molar de metaperiodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente alrededor de 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 exceso molar de meta periodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguida de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 6.423.685,

50 **V. Derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales**

55 **[0286]** En otro aspecto descrito en el presente documento se encuentran métodos, estrategias y técnicas para incorporar al menos uno de tales derivados de enlazadores de dolastatina en un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos derivados de enlazadores de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales. También se incluyen con este aspecto las composiciones y los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar oligonucleótidos (incluidos el ADN y el ARN) que se pueden usar para producir, al menos en parte, un derivado de enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto composiciones y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar células que pueden expresar tales oligonucleótidos que pueden usarse para producir, al menos en parte, un derivado de enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural.

65 **[0287]** Por lo tanto, los derivados del enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina se proporcionan y se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina con al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina incluyen al menos una modificación

postraducciona en alguna posición en el polipéptido. En algunas realizaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona se produce a través de la maquinaria celular (p. ej., glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace glicolípido y similares), en muchas instancias, tales modificaciones co-traductoraa o post-traduccionaa basadas en maquinaria celular ocurren en los sitios de aminoácidos de origen natural en el polipéptido, sin embargo, en ciertas realizaciones, las modificaciones co-traduccionaa o post-traduccionaa basadas en maquinaria celular se producen en los sitios de aminoácidos no naturales en el polipéptido.

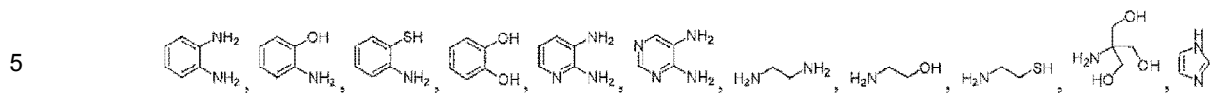
[0288] En otras realizaciones, la modificación postraducciona no utiliza la maquinaria celular, pero la función se proporciona en su lugar mediante la unión de una molécula (un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado del polietilenglicol, un segundo). proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y cualquier combinación de los mismos, que comprende un segundo grupo reactivo al al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales que contienen un grupo funcional cetona, aldehído, acetal, hemiacetal, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina, que utilizan la metodología química descrita en este documento, u otros adecuados para los grupos reactivos particulares. En ciertas realizaciones, la modificación co-traducciona o post-traducciona se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. En ciertas realizaciones, la modificación postraducciona se realiza *in vitro* y no utiliza la maquinaria celular. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar Dichos derivados de enlazadores de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales modificados de forma traducciona o postranslaciona.

[0289] También se incluyen dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento son reactivos capaces de reaccionar con un derivado de enlazador de dolastatina (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo oxima, alquino, cicloalkyne, azida, grupo hidroxilamina, o formas enmascaradas o protegidas de los mismos) que forma parte de un polipéptido para producir cualquiera de las modificaciones postraduccionaa mencionadas anteriormente. En ciertas realizaciones, el derivado de enlazador de dolastatina modificado post-traducciona contendrá al menos un grupo oxima; el derivado del enlazador de dolastatina que contiene oxima modificada resultante puede sufrir reacciones de modificación subsiguientes. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos reactivos que son capaces de cualesquiera modificaciones post-traduccionaa de tales derivados de enlazador de dolastatina.

[0290] En ciertas realizaciones, el polipéptido o el derivado de dolastatina unido a un aminoácido no natural incluye al menos una modificación co-traducciona o postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula huésped, donde la modificación postraducciona normalmente no se realiza por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye al menos una modificación co-traducciona o post-traducciona que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, donde la modificación co-traducciona o post-traducciona normalmente no es hecha por una célula no eucariota. Los ejemplos de tales modificaciones co-traduccionaa o post-traduccionaa incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de enlaces de glicolípidos, y similares. En una realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (que incluye pero no se limita a, donde el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido (incluyendo pero no limitado a, Gal-GalNAC, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por GalNAC-serina, GalNAC-treonina, GlcNAc-serina, o un enlace GlcNAc-treonina. En ciertas realizaciones, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una etiqueta de polihistidina, una fusión de GST, y/o similares. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales polipéptidos que contienen al menos una modificación co-traducciona o post-traducciona. En otras realizaciones, el polipéptido de aminoácido no natural glicosilado se produce en una forma no glicosilada. Dicha forma no glicosilada de un aminoácido no natural glicosilado puede producirse mediante métodos que incluyen la eliminación química o enzimática de grupos oligosacáridos de un polipéptido de aminoácido no natural glicosilado aislado o sustancialmente purificado o no purificado; la producción de un aminoácido no natural en un huésped que no glicosila tal como un polipéptido de aminoácido no natural (como un huésped que incluye, procariotas o eucariotas modificados o mutados para no glicosilar dicho polipéptido), la introducción de un inhibidor de la glicosilación en el medio de cultivo celular en el que un polipéptido de aminoácido no natural está siendo producido por un eucariota que normalmente glicosilaría tal polipéptido, o una combinación de cualquiera de tales métodos. También se describen en el presente documento tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (por glicosilado normalmente significa un polipéptido que se glicosilaría cuando se produjera en condiciones en las que los polipéptidos naturales se glicosilan). Por supuesto, tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (o de hecho cualquier polipéptido descrito en el presente documento) pueden estar en una forma no purificada, una forma sustancialmente purificada o en una forma aislada.

[0291] En ciertas realizaciones, el polipéptido de aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza en presencia de un acelerante, en el que la modificación postraducciona es estequiométrica, similar a la estequiométrica, o casi estequiométrica. En otras realizaciones, el polipéptido se pone en contacto con un reactivo de Fórmula (XIX) en presencia de un acelerante. En otras realizaciones, el acelerante se

selecciona del grupo que consiste en:



y

10



15

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

20

[0292] Los derivados de aminoácidos dolastatina no naturales ligados que contienen un grupo oxima permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos carbonilo reactivo o dicarbonilo (incluyendo pero no limitado a, cetonas, aldehídos, u otros grupos con reactividad similar) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Tal reacción de intercambio de oxima permite una mayor funcionalización de los derivados unidos a dolastatina. Además, el derivado enlazado a dolastatina original que contiene un grupo oxima puede ser útil por sí mismo siempre que el enlace oxima sea estable en las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (p. ej., los métodos sintéticos *in vivo*, *in vitro* y químicos). aquí descritos).

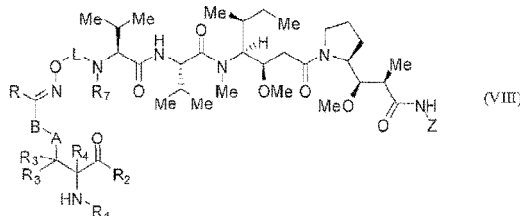
25

[0293] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas aquí son aminoácidos no naturales unidos a derivados de dolastatina con cadenas laterales que comprenden un grupo oxima, un grupo similar a la oxima (que tiene una reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo de oxima enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo de oxima), o un grupo de oxima protegido (que tiene una reactividad similar a la de un grupo de oxima en caso de desprotección).

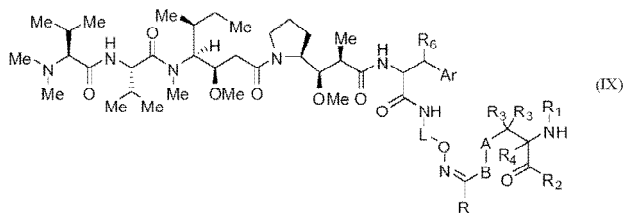
30

[0294] Tales derivados de aminoácidos no naturales unidos a dolastatina incluyen derivados unidos a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (VIII) o (IX):

35



45



55

en donde:

60

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

65

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, 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 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;

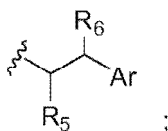
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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

Z tiene la estructura de:



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

R⁸ es OH

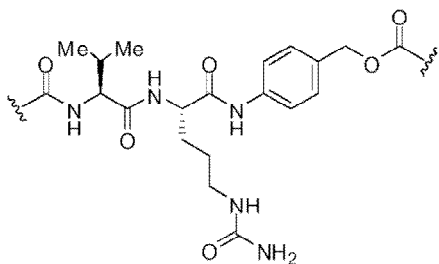
R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

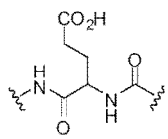
R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en-alquileno-, -alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-alquileno-, -(O alquileno)_n-alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-W-, -alquileno-C(O)-W-, -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-C(O)-, y -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-;

W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:



y

cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno; en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;

en donde alquileno inferior significa un grupo alquileno con ocho o menos átomos de carbono; o un metabolito activo o solvato del mismo.

[0295] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), Ar es fenilo. En ciertas formas de ejecución de los compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 20, En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 10, En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 5,

[0296] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es hidrógeno.

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)-, -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;

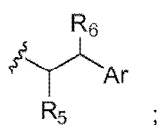
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆, o tiazol;

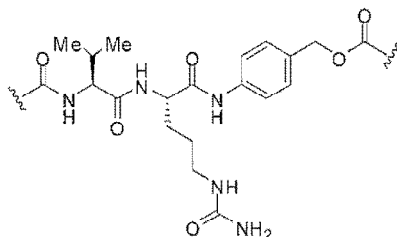
R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

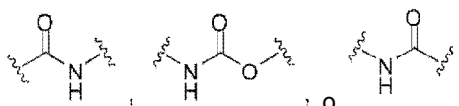
R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L₁, L₂, L₃ y L₄ son, cada uno, enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-J-, -alquileno'-J-(alquileno-O)_n-alquileno-, -J-(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-J-(alquileno-O)_n'alquileno'-J-', -(alquileno-O)_n-alquileno-J-alquileno'-, -W-, -alquileno-W-, alquileno'-J-(alquileno-NMe)_n-alquileno-W-, -J-(alquileno-NMe)_n-alquileno-W-, -J-alquileno-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W-, y alquileno-J-alquileno'-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W-;

W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:



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

[0306] En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), Ar es fenilo, en ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es metilo, en ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 20, En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 10 En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 5,

[0307] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es tiazol. En ciertas

realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en el que alquileo es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0308] En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en el que n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0309] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es H. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es hidroxilo.

[0310] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), Ar es fenilo.

[0311] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es hidrógeno.

[0312] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada uno de L₁, L₂, L₃, y L₄ es independientemente un enlazador escindible o enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada uno de L₁, L₂, L₃, y L₄ es independientemente un enlazador oligo(etilenglicol) derivatizado.

[0313] En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada alquileo, alquileo', alquileo", y alquileo" independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0314] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada n y n' independientemente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0315] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₁ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₂ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el polipéptido es un anticuerpo, En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el anticuerpo es herceptina.

[0316] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son de pH 2 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente post traduccionalmente modificado.

[0317] Los aminoácidos no naturales basados en oxima pueden sintetizarse por métodos ya descritos en la técnica, o por métodos descritos en el presente documento, que incluyen: (a) reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con reactivo que contiene un carbonilo o dicarbonilo; (b) reacción de un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo con un reactivo que contiene hidroxilamina; o (c) reacción de un aminoácido no natural que contiene oxima con ciertos reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

VI. Localización de aminoácidos no naturales en derivados del enlazador de dolastina

[0318] Los métodos y composiciones descritos en la presente invención incluyen la incorporación de uno o más

aminoácidos no naturales en un derivado de enlazador de dolastatina. Se pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones particulares que no interrumpan la actividad del derivado enlazante de dolastatina. Esto se puede lograr haciendo sustituciones "conservadoras", que incluyen, entre otras, la sustitución de aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófobos no naturales o naturales, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos no naturales o naturales, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos no volátiles, aminoácidos naturales o hidrófilos naturales) y/o la inserción del aminoácido no natural en una ubicación que no se requiere para la actividad.

[0319] Se puede emplear una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del derivado enlazante de dolastatina. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural está unido en el extremo C del derivado de dolastatina. En otras realizaciones, el aminoácido no natural está unido en el extremo N del derivado de dolastatina. Cualquier posición del derivado del enlazador de dolastatina es adecuada para que la selección incorpore un aminoácido no natural, y la selección puede basarse en un diseño racional o por selección aleatoria para uno o ningún propósito particular deseado. La selección de los sitios deseados puede basarse en la producción de un polipéptido de aminoácido no natural (que pueden modificarse aún más o permanecer sin modificar) que tengan cualquier propiedad o actividad deseada, incluidos, entre otros, moduladores de unión al receptor, moduladores de la actividad del receptor, moduladores de la unión a las parejas de unión, moduladores de la actividad de la pareja de unión, moduladores de la conformación de la pareja de unión, formación de dímeros o multímeros, ningún cambio en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o la manipulación de cualquier propiedad física o química del polipéptido, como la solubilidad, agregación o estabilidad. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones en serie en cada posición en la cadena polipeptídica con un aminoácido no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para uso en los métodos, técnicas y composiciones descritas en el presente documento.

[0320] La estructura y la actividad de mutantes de origen natural de un polipéptido que contiene deleciones también pueden ser examinadas para determinar las regiones de la proteína que son susceptibles de ser tolerantes de sustitución con un aminoácido no natural. Una vez que se eliminan los residuos que probablemente sean intolerantes a la sustitución con aminoácidos no naturales, el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes se puede examinar utilizando métodos que incluyen, entre otros, la estructura tridimensional de la estructura. El polipéptido relevante, y cualquier ligando o proteína asociada, las estructuras cristalográficas de rayos X y RMN de muchos polipéptidos están disponibles en el Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos, uno puede usarse para identificar posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse con aminoácidos no naturales. Además, se pueden hacer modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si se cuenta con datos estructurales tridimensionales no disponibles. Por lo tanto, la identidad de las posiciones de aminoácidos que se pueden sustituir con aminoácidos no naturales se puede obtener fácilmente.

[0321] Los sitios ejemplares de incorporación de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están excluidos de las regiones de unión a receptores potenciales, o las regiones para la unión a proteínas o ligandos de unión pueden estar total o parcialmente expuestas a disolventes, tienen interacciones mínimas o nulas con enlaces de hidrógeno con residuos cercanos, pueden exponerse mínimamente a residuos reactivos cercanos, y/o pueden estar en regiones altamente flexibles según lo predicho por la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido particular con su receptor asociado, ligando o proteínas de unión.

[0322] Una amplia variedad de aminoácidos no naturales puede ser sustituida por, o incorporada en, una posición dada en un polipéptido. A modo de ejemplo, un aminoácido no natural particular puede seleccionarse para su incorporación en base a un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido con sus ligandos, receptores y/o proteínas de unión asociados, una preferencia por sustituciones conservativas.

[0323] En una realización, los métodos descritos en este documento incluyen la incorporación en el derivado de enlazador de dolastatina, en donde el derivado de enlazador de dolastatina comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto el derivado de enlazador de dolastatina con una molécula (que incluye pero no se limita a una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de hidroxilamina y el segundo grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto hidroxilamina, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto oxima, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto oxima y el segundo grupo reactivo es el resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima.

[0324] En algunos casos, la(s) incorporación(es) del derivado de enlazador de dolastatina se combinará(n) con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido para afectar otros rasgos químicos, físicos, farmacológicos y/o biológicos. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad (incluida, entre otras, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o aumentar la afinidad del polipéptido por su receptor, ligando y/o proteínas de unión apropiados. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo pero no limitado a, cuando se expresan en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido. En algunas realizaciones, los sitios se seleccionan para la sustitución con un aminoácido codificado naturalmente o no natural, además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural con el propósito de aumentar la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli*, u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad por el ligando asociado, las proteínas de unión y/o el receptor, modula (incluyendo pero no limitado a, aumenta o disminuye) la dimerización del receptor, estabiliza los dímeros receptores, modula la vida media circulante, modula la liberación o la biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una vía particular de administración. De manera similar, el polipéptido de aminoácido no natural puede comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (incluidos, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias a base de afinidad (incluyendo pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo pero no limitado a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo pero no limitado a, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación o activación de profármacos, reducción de tamaño u otros rasgos del polipéptido.

VII. El gen de PSMA como ejemplo

[0325] Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento no se limitan a un tipo particular, la clase o familia de polipéptidos o proteínas. De hecho, virtualmente cualquier polipéptido puede diseñarse o modificarse para incluir al menos un aminoácido no natural "modificado o no modificado" que contiene un derivado de enlazador de dolastatina descrito aquí. Solo a modo de ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: alfa-1 antitripsina, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal (p. ej., bevacizumab, cetuximab, panitumumab, infliximab, adalimumab, basiliximab, daclizumab, omalizumab, ustekinumab, etanercept, gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, palivizumab, y abciximab), apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimioquina CXC, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-C, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citocina, quimiocina CC, proteína-1 quimioatrayente monocito, proteína-2 quimioatrayente monocitos, proteína-3 quimioatrayente monocitos, proteína-1 alfa inflamada monocitos, proteína-i beta inflamada monocitos, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, factor estimulador de colonia (LCR), factor de complemento 5a, inhibidor de complemento, receptor de complemento 1, citoquina, péptido activador de neutrófilos epiteliales-78, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido activador de neutrófilos epiteliales, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, factor IX, factor VII, factor VIII, factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, proteína del paquete de cuatro hélices, G-CSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, crecimiento factor, receptor del factor de crecimiento, grF, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF), hirudina, hormona del crecimiento humano (hGH), albúmina de suero humano, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, interleucina (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento de queratinocito (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de la leucemia, luciferasa, neurturina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto oncogénico, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleiotropina, proteína A, proteína G, pTH, exotoxina pirogénica A, exotoxina pirogénica B, exotoxina pirogénica C, pyy, relaxina, renina, SCF, pequeña proteína biosintética, receptor soluble del complemento I, I-CAM soluble, receptor soluble de interleucina, receptor soluble del TNF, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina de estafilococos, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormona esteroide, dismutasa de superóxido, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador de plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raF, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de testosterona Ptor, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona.

[0326] Por lo tanto, la siguiente descripción de ARX- α PSMA se proporciona con fines ilustrativos y solo a modo de ejemplo, y no como un límite en el alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento. Además, la referencia al trastuzumab en esta solicitud pretende utilizar el término genérico como ejemplo de cualquier anticuerpo. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y los compuestos químicos descritos en el presente documento con referencia al trastuzumab se pueden aplicar igualmente a cualquier anticuerpo o anticuerpo monoclonal, incluidos los enumerados específicamente en este documento.

[0327] ARX- α PSMA es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata. El antígeno de membrana específico de la próstata es una proteína de

membrana de tipo II que se expresa mucho, p. ej., en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), los cánceres primarios de próstata y los cánceres metastásicos de próstata. Para los fines de esta invención, es posible que el anticuerpo α PSMA sea cualquier anticuerpo PSMA conocido con un aminoácido no codificado de forma natural. Para propósitos de ilustración, los anticuerpos ARX- α PSMA se describen en la Tabla 1,

5 **[0328]** En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada de anticuerpo α PSMA seleccionada de SEQ ID NO.S 2 y 9-14. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo α PSMA comprende la SEQ ID NO. 2 en donde la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos no codificados de forma natural. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo α PSMA comprende la SEQ ID NO. 1 en donde la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos no codificados de forma natural. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α PSMA con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sustituidos en una o más posiciones de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y ligera como se presenta en la Tabla 1 (SEQ ID NO.s 1 y 2). En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende la cadena ligera de la SEQ ID NO: 1 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en una posición con alta accesibilidad a la superficie y un sitio que será de carga neutra al anticuerpo. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en una posición con alta accesibilidad a la superficie y un sitio que será de carga neutral para el anticuerpo. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 90% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 90% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácido con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural y un 95% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, un aminoácido no codificado de forma natural y 95% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 96% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y un 96% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 97% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos no naturales codificados y un 97% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 98% de homología con la SEQ ID. NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y un 98% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y al menos un 98% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos: aminoácidos no codificados de forma natural y al menos un 98% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no naturales codificados y 99% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 99% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y al menos un 99% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α PSMA que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y al menos un 99% de homología con la SEQ ID NO: 2. La selección del sitio de aminoácidos codificados de forma no natural se describe dentro de esta especificación, y como específicamente se refiere a los anticuerpos α -PSMA, los sitios se seleccionaron según la exposición a la superficie/accesibilidad al sitio dentro del anticuerpo y se seleccionaron los sitios de aminoácidos hidrófobos/neutros para mantener la carga en el anticuerpo.

60

65

Tabla 1: ARX- α PSMA (A116)

αPSMA Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 1)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
αPSMA Cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 2)	
1	EVQLQQSGPE LVKPGTSVRI SCKTSGYTFT EYTIHWVKQS HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY NQKFEDKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED SAVVYCAAGW
101	NFDYWGQGT LTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR BEQYNSYTRV
301	VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SPSG
ARX-αPSMA(S7) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 3)	
1	DIVMTQ*HKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
ARX-αPSMA(R18) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 4)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGD*VS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDRQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
ARX-αPSMA(Q79) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 5)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNV*S EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
ARX-αPSMA(T109) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 6)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKR*V AAPSVFIFPP SDRQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
ARX-αPSMA(Q155) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 7)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDRQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNAL*SGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN RGEC
ARX-αPSMA(S202) Cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 8)	
1	DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS IICKASQDVG TAVDWYQQKP GQSPKLLIYW
51	ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS EDLADYFCQQ YNSYPLTFGA
101	GTMLDLKRTV AAPSVFIFPP SDRQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201	L*SPVTKSFN RGEC

(continúa)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ARX-α PSMA(A116) Cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 9)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWQGGTT	LTVSS*STKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THCPCPCPAP	ELGGPSVFL	FPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSL	LSPG
ARX-α PSMA(V280) Cadena (SEQ. ID. NO.: 10)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWQGGTT	LTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THCPCPCPAP	ELGGPSVFL	FPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDG*	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSL	LSPG
ARX-α PSMA(Y294) Cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 11)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWQGGTT	LTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVVTVPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THCPCPCPAP	ELGGPSVFL	FPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQ*NSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCVMHEAL	HNHYTQKSL	LSPG

(continúa)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ARX-αPSMA(Q340) cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 12)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWGQGT	LTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVTPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKT KPR	EEQYNSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKG*	PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG
ARX-αPSMA(N359) cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 13)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWGQGT	LTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVTPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKT KPR	EEQYNSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
351	PSRDELTK*Q	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG
ARX-αPSMA(Q417) cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 14)					
1	EVQLQQSGPE	LVKPGTSVRI	SCKTSGYTFT	EYTIHWVKQS	HGKSLEWIGN
51	INPNNGGTTY	NQKPEDKATL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAAGW
101	NFDYWGQGT	LTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KSTSGGTAAL	GCLVKDYFPE
151	PVTVSWNSGA	LTSGVHTFPA	VLQSSGLYSL	SSVTVTPSSS	LGTQTYICNV
201	NHKPSNTKVD	KKVEPKSCDK	THTCPPCPAP	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM
251	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKT KPR	EEQYNSTYRV
301	VSVLTVLHQD	WLNKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLF
351	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG
401	SFFLYSKLTV	DKSRWQ*GNV	FSCSVMHEAL	HNHYTQKSLS	LSPG

anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α PSMA de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA.

[0331] Como un ejemplo adicional, no limitativo, la siguiente descripción del trastuzumab del anticuerpo HER2 se proporciona con fines ilustrativos y solo a modo de ejemplo, y no como un límite en el alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento. Además, la referencia al trastuzumab en esta solicitud pretende utilizar el término genérico como ejemplo de cualquier anticuerpo. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y los compuestos químicos descritos en el presente documento con referencia al trastuzumab se pueden aplicar igualmente a cualquier anticuerpo o anticuerpo monoclonal, incluidos los enumerados específicamente en este documento.

[0332] Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor HER2/neu. El gen HER2 (también conocido como HER2/neu y el gen ErbB2) se amplifica en un 20-30% de cánceres de mama en etapa, lo que lo hace sobreexpresado. Además, en el cáncer, el HER2 puede enviar señales sin que lleguen mitógenos y se unan a cualquier receptor, haciéndolo hiperactivo.

[0333] HER2 se extiende a través de la membrana celular y transporta señales desde el exterior de la célula hacia el interior. En personas sanas, los compuestos de señalización llamados mitógenos llegan a la membrana celular y se unen a la parte externa de otros miembros de la familia de receptores HER. Esos receptores enlazados se enlazan (dimerizan) con HER2, activándolo. HER2 luego envía una señal al interior de la célula. La señal pasa por diferentes vías bioquímicas. Esto incluye la ruta PI3K/Akt y la ruta MAPK. Estas señales promueven la invasión, la supervivencia y el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) de las células.

[0334] Las células tratadas con trastuzumab se detienen durante la fase G1 del ciclo celular, por lo que se reduce la proliferación. Se ha sugerido que el trastuzumab induce parte de su efecto mediante la regulación a la baja de HER2/neu, lo que conduce a la interrupción de la dimerización del receptor y la señalización a través de la cascada PI3K descendente. P27Kip1 entonces no está fosforilado y es capaz de ingresar al núcleo e inhibir la actividad de cK2, causando la detención del ciclo celular. Además, el trastuzumab suprime la angiogénesis mediante la inducción de factores antiangiogénicos y la represión de los factores proangiogénicos. Se cree que una contribución al crecimiento no regulado observado en el cáncer podría deberse a la escisión proteolítica de HER2/neu que resulta en la liberación del dominio extracelular. Se ha demostrado que el trastuzumab inhibe la división de ectodominio HER2/neu en células de cáncer de mama.

VIII. Captación celular de aminoácidos no naturales.

[0335] La captación de aminoácidos no naturales por una célula eucariota es una cuestión que se considera típicamente al diseñar y seleccionar aminoácidos no naturales, que incluyen, entre otros, la incorporación a una proteína. P. ej., la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales son absorbidos por las células eucariotas a través de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Se puede hacer un examen rápido que evalúe qué aminoácidos no naturales, si los hay, son captados por las células (los ejemplos 15 y 16 en este documento ilustran ejemplos no limitativos de pruebas que pueden realizarse con aminoácidos no naturales). Ver, p. ej., los ensayos de toxicidad en, p. ej., la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2004/198637 titulada "Protein Arrays and Liu, DR & Schultz, PG (1999). Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96: 4780-4785, Aunque la captación se analiza fácilmente con varios ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que son susceptibles a las vías de captación celular es proporcionar rutas biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

[0336] Típicamente, el aminoácido no natural producido a través de la captación celular como se describe en el presente documento se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficiente, que incluye pero no se limita a una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que afectar la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM.

VII. Biosíntesis de aminoácidos no naturales

[0337] Ya existen muchas rutas biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Mientras que un método biosintético para un aminoácido no natural particular puede no existir en la naturaleza,

incluyendo pero no limitado a, en una célula, los métodos y composiciones descritos en este documento proporcionan dichos métodos. P. ej., las rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales se pueden generar en la célula huésped agregando nuevas enzimas o modificando las rutas existentes de la célula huésped. Nuevas enzimas adicionales incluyen enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. P. ej., la biosíntesis de p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas pueden introducirse en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una vía enzimática para sintetizar el compuesto deseado. En este documento se proporcionan ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente. Secuencias adicionales de enzimas se encuentran, p. ej., en Genbank. Las enzimas desarrolladas artificialmente se pueden agregar a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

[0338] Una variedad de métodos están disponibles para la producción de nuevas enzimas para su uso en rutas biosintéticas o para la evolución de rutas existentes. P. ej., la recombinación recursiva, que incluye pero no se limita a, según lo desarrollado por Maxygen, Inc. (disponible en la web en www.maxygen.com), puede usarse para desarrollar nuevas enzimas y vías. Ver, p. ej., Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* 370 (4): 389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.*, 91:10747-10751, de manera similar, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en la red mundial en genencor.com) se usa opcionalmente para el diseño de vías metabólicas, que incluye, entre otros, para diseñar una vía para crear un aminoácido no natural en una célula. Esta tecnología reconstruye las rutas existentes en los organismos huésped mediante una combinación de nuevos genes, incluidos, entre otros, los identificados a través de la genómica funcional, la evolución molecular y el diseño. Diversa Corporation (disponible en la red mundial en diversa.com) también proporciona tecnología para detectar rápidamente bibliotecas de genes y vías genéticas, que incluyen, entre otras, la creación de nuevas vías para la producción de aminoácidos no naturales de forma biosintética.

[0339] Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética diseñada como se describe en este documento se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficiente, que incluye pero no se limita a una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que afectar la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que comprende los genes utilizados para producir las enzimas deseadas para una vía específica y se genera un aminoácido no natural, las selecciones *in vivo* se usan opcionalmente para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural para síntesis de proteínas ribosomales y crecimiento celular.

X. Metodología sintética adicional

[0340] Los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando metodologías descritas en la técnica o usando las técnicas descritas en este documento o por una combinación de los mismos. Como ayuda, la siguiente tabla proporciona varios electrófilos y nucleófilos de partida que pueden combinarse para crear un grupo funcional deseado. La información proporcionada pretende ser ilustrativa y no limitativa a las técnicas sintéticas descritas en este documento.

Tabla 2: Ejemplos de enlaces covalentes y sus precursores

	Producto de enlace covalente	Electrófilo	Nucleófilo
5	Carboxamidas	Ésteres activados	aminas/anilinas
	Carboxamidas	acil azidas	aminas/anilinas
	Carboxamidas	acil haluros	aminas/anilinas
	Ésteres	acil haluros	alcoholes/fenoles
10	Ésteres	acil nitriles	alcoholes/fenoles
	Carboxamidas	acil nitriles	aminas/anilinas
	Iminas	Aldehidas	aminas/anilinas
	Hidrazonas	Aldehidas o cetonas	Hidrazinas
15	Producto de enlace covalente	Electrófilo	Nucleófilo
	Oximas	Aldehidas o cetonas	Hidroxi laminas
	Alquil aminas	Alquil haluros	aminas/anilinas
	Ésteres	Alquil haluros	ácidos carboxílicos
20	Tioéteres	Alquil haluros	tioles
	Éteres	Alquil haluros	alcoholes/fenoles
	Tioéteres	Alquil sulfonatos	tioles
	Ésteres	Alquil sulfonatos	ácidos carboxílicos
	Eteres	Alquil sulfonatos	alcoholes/fenoles
25	Ésteres	Anhídridos	alcoholes/fenoles
	Carboxamidas	Anhídridos	aminas/anilinas
	Producto de enlace covalente	Electrófilo	Nucleófilo
	Tiofenoles	aril haluros	Tioles
30	Aril aminas	aril haluros	Aminas
	Tioéteres	Azindinas	Tioles
	Ésteres de boronato	Boronatos	Glicoles
	Carboxamidas	ácidos carboxílicos	aminas/anilinas
35	Ésteres	ácidos carboxílicos	Alcoholes
	hidrazinas	Hidrazidas	ácidos carboxílicos
	N-acilureas o anhídridos	carbodiimidas	ácidos carboxílicos
	Ésteres	diazoalcanos	ácidos carboxílicos
40	Tioéteres	Epóxidos	Tioles
	Tioéteres	haloacetamidas	Tioles
	Ammotriazinas	halotriazinas	aminas/anilinas
	Éteres de triazinilo	halotriazinas	alcoholes/fenoles
45	Amidines	Ésteres imido	aminas/anilinas
	Ureas	Isocianatos	aminas/anilinas
	Uretanos	Isocianatos	alcoholes/fenoles
	Tioureas	isotiocianates	aminas/anilinas
50	Tioéteres	Maleimidias	Tioles
	Ésteres de fosfito	fosforamiditas	Alcoholes
	Silil Eteres	haluros de sililo	Alcoholes
	Alquil aminas	Ésteres de sulfonato	aminas/anilinas
55	Tioéteres	Ésteres de sulfonato	Tioles
	Ésteres	Ésteres de sulfonato	ácidos carboxílicos
	Eteres	Ésteres de sulfonato	Alcoholes
	Sulfonamidas	haluros de sulfonilo	aminas/anilinas
60	Ésteres de sulfonato	haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes

[0341] En general, los electrófilos carbonados son susceptibles al ataque por nucleófilos complementarios, incluyendo nucleófilos de carbono, donde un nucleófilo atacante aporta un par de electrones al electrófilo de carbono con el fin de formar un nuevo enlace entre el nucleófilo y el electrófilo de carbono.

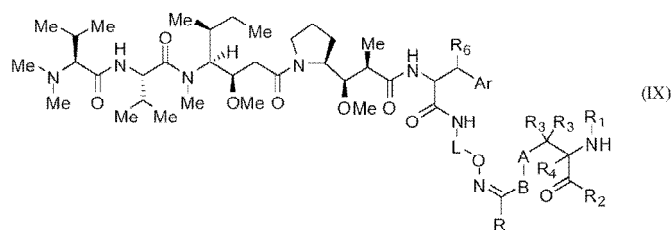
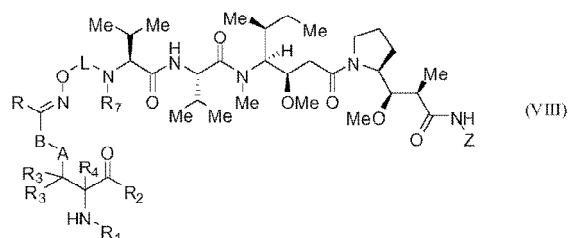
[0342] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen, pero no se limitan a alquilo, alqueno, arilo y

alquilino de Grignard, organolitio, organocinc, reactivos estaño de alquilo, alquenilo, arilo y alquilino (organoestannanos), reactivos borano de alquilo, alquenilo, arilo y alquilino (organoboranos y organoboratos); estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser cinéticamente estables en agua o en disolventes orgánicos polares. Otros ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen los iluros de fósforo, enol y reactivos de enolato; estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de generar a partir de

precusores bien conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética. Los nucleófilos de carbono, cuando se utilizan junto con los electrófilos de carbono, generan nuevos enlaces carbono-carbono entre el nucleófilo de carbono y el electrófilo de carbono.

[0343] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos no son de carbono adecuados para el acoplamiento a electrófilos carbonados incluyen, pero no se limitan a aminas primarias y secundarias, tioles, tiolatos, y tioéteres, alcoholes, alcóxidos, azidas, semicarbazidas, y similares. Estos nucleófilos sin carbono, cuando se usan junto con los electrófilos de carbono, típicamente generan enlaces heteroátomos (C-X-C), donde X es un heteroátomo, que incluye, entre otros, oxígeno, azufre o nitrógeno.

[0344] La presente invención proporciona un compuesto que comprende la fórmula (VIII) o (IX), en el que el compuesto es un anticuerpo antígeno prostático específico de la membrana (α PSMA) conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde las fórmulas (VIII) y (IX) corresponden a:



en donde:

A es opcional y, cuando está presente, es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquilileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno sustituido, arileno, arileno sustituido, heterarileno, 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)-, -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;

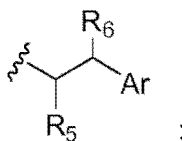
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo α PSMA;

en donde el anticuerpo α PSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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

Z tiene la estructura de:

5



10

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

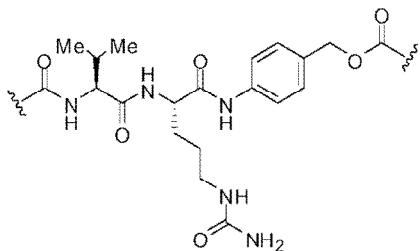
15

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en-alquileno-, -alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-W-, -alquileno-C(O)-W-, -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-C(O)-, y -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-;

20

W tiene la estructura de:

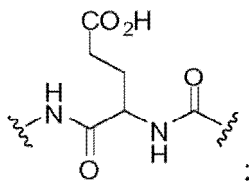
25



30

U tiene la estructura de:

35



40

y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;
 en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;
 en donde alquileno inferior significa un grupo alquileno con ocho o menos átomos de carbono;
 o un metabolito activo o solvato del mismo. Las realizaciones adicionales de la presente invención incluyen el compuesto en el que R₁ es un polipéptido. En otras realizaciones de la presente invención R₁ es un anticuerpo. En otra realización de la presente invención, R₁ es un anticuerpo de antígeno de membrana anti-próstata-específica (αPSMA). En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo αPSMA comprende un aminoácido no codificado de forma natural. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo αPSMA comprende más de un aminoácido no codificado de forma natural. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo αPSMA comprende al menos uno y no más de diez aminoácidos no codificados de forma natural. En otras realizaciones de la presente invención, R₂ es un polipéptido. En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es un anticuerpo. En otras realizaciones de la presente invención, R₂ es un anticuerpo αPSMA. En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es un anticuerpo αPSMA que comprende un aminoácido codificado de forma no natural. En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es un anticuerpo αPSMA que comprende uno o más aminoácidos codificados no naturales. En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es un anticuerpo αPSMA que comprende al menos uno y no más de diez aminoácidos no codificados de forma natural.

60

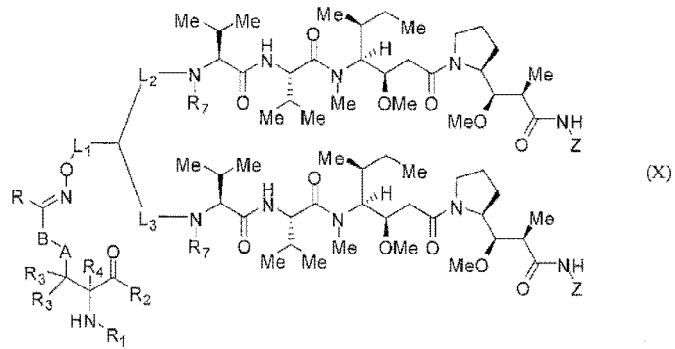
[0345] La presente invención también proporciona un compuesto, o sal del mismo, que comprende la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), en donde el compuesto es un anticuerpo antígeno prostático específico de la membrana (αPSMA) conjugado a una dolastatina, en donde la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) corresponde a:

65

5

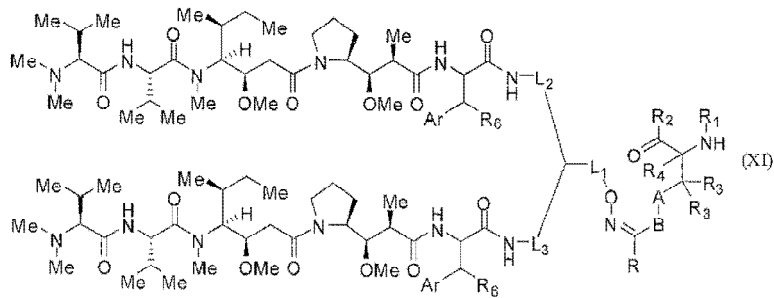
10

15



20

25

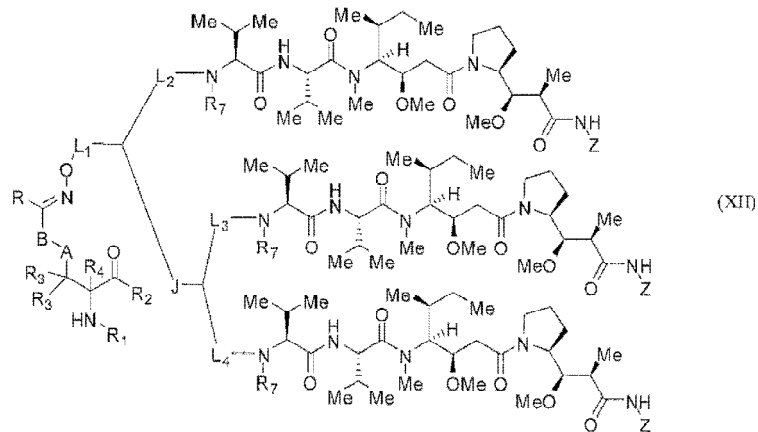


30

35

40

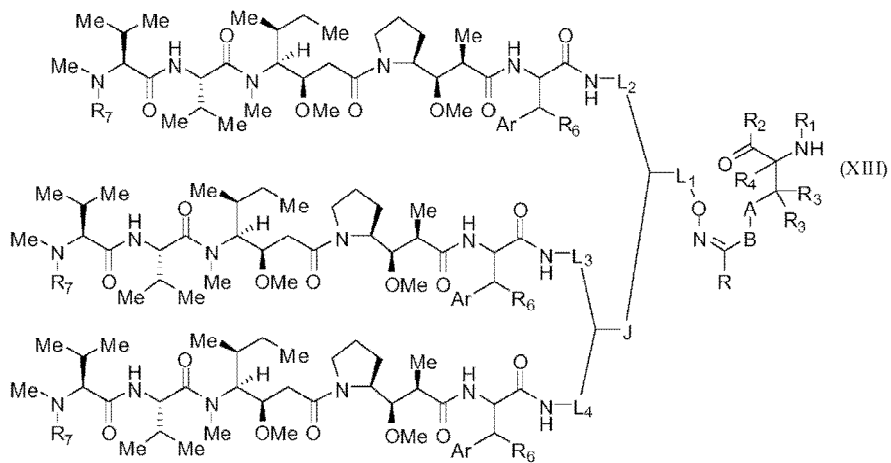
45



50

55

60



65 en donde:

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

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -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;

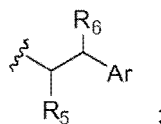
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, CO₂H, C₁-C₆ alquilo, o tiazol;

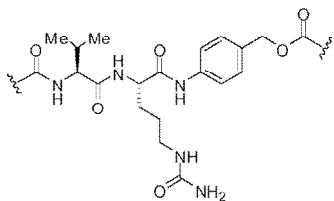
R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

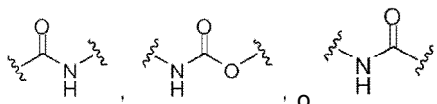
R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L₁, L₂, L₃ y L₄ son, cada uno, enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, -alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n'-alquileo-J'-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo"-W-, y alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

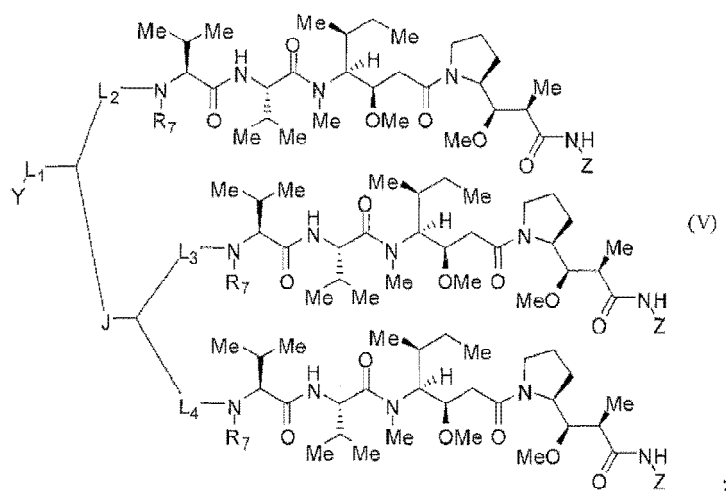
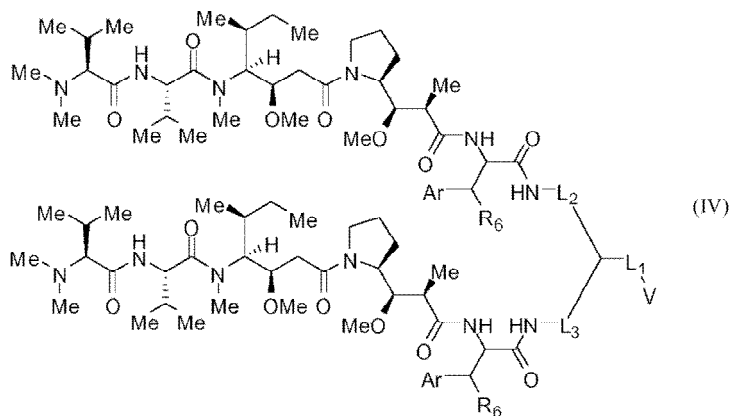
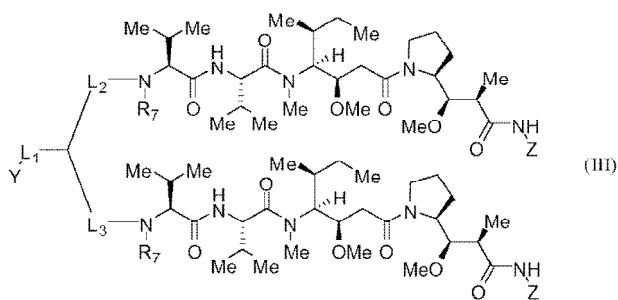
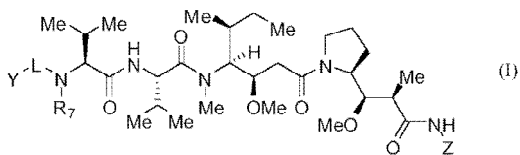


y

cada n y n' son independientemente enteros mayores o iguales a uno; en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;

en donde alquileo inferior significa un grupo alquileo con ocho o menos átomos de carbono. En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En otras realizaciones, R₁ es un anticuerpo αPSMA. En algunas realizaciones, R₂ es un polipéptido. En otras realizaciones, R₂ es un anticuerpo αPSMA.

[0346] La presente invención también proporciona un método para la derivatización de un análogo de dolastatina comprende la Fórmula (I), (III), (IV), (V) o (VI), en el que el análogo de dolastatina derivatizado es un anticuerpo α PSMA conjugado con una dolastatina, en la que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, el método comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de fórmula (XXXVII), en donde la fórmula (I), (III), (IV), (V), o (VI) corresponden a:



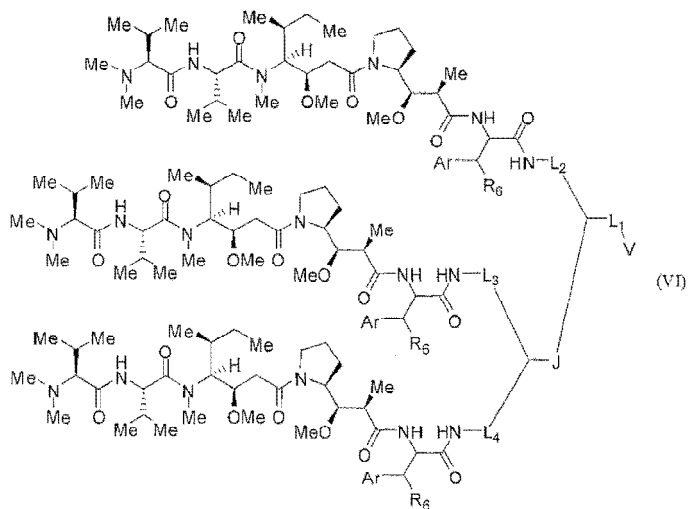
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

5

10

15

20

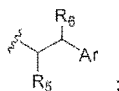


en donde:

25

Z tiene la estructura de:

30



35

R₅ es H, COR₈, C₁-C₆ alquilo, o tiazol;
 R₆ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

40

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y y V son NH₂-O-;

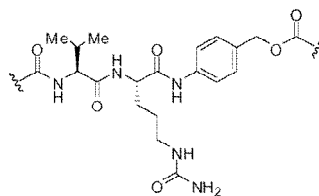
45

L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquileo, alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n- alquileo, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n -NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n'-alquileo-J'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, y J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-; -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo"-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

50

W tiene la estructura de:

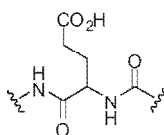
55



60

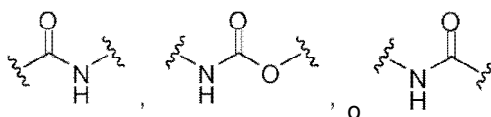
U tiene la estructura de:

65



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

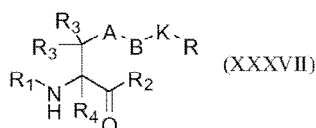
5



10

o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈, y R₈ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂; y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno; en donde Formula (XXXVII) corresponde a:

15



20

en donde:

25

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

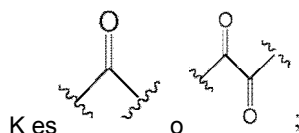
30

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, -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;

35

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

40



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

45

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; y

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o

50

R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;

en donde alquileo inferior significa un grupo alquileo con ocho o menos átomos de carbono.

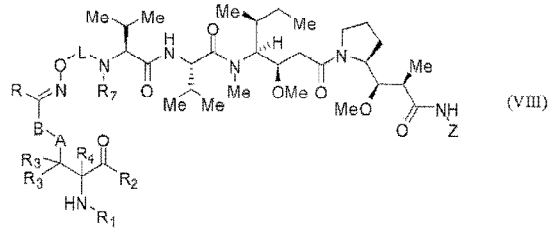
55

[0347] Otra realización de la presente invención proporciona un método para la derivatización de un análogo de dolastatina que comprende al menos una oxima que contiene aminoácido que tiene la estructura de Fórmula (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), o (XIII):

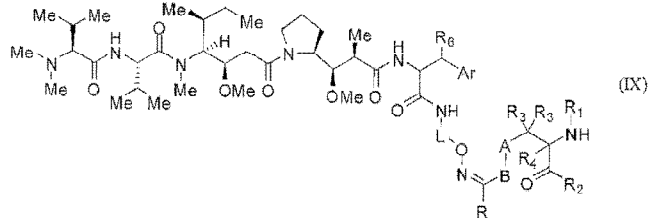
60

65

5



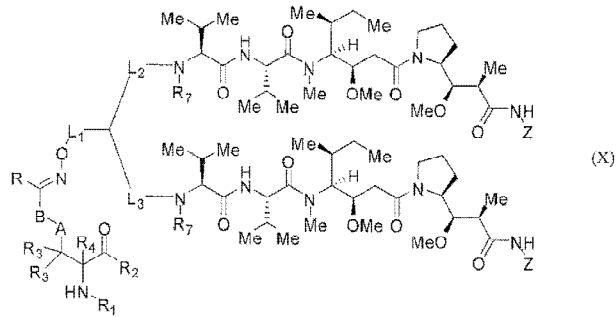
10



15

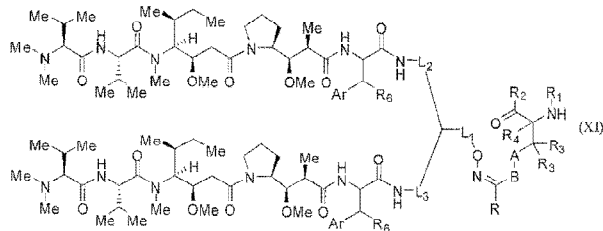
20

25



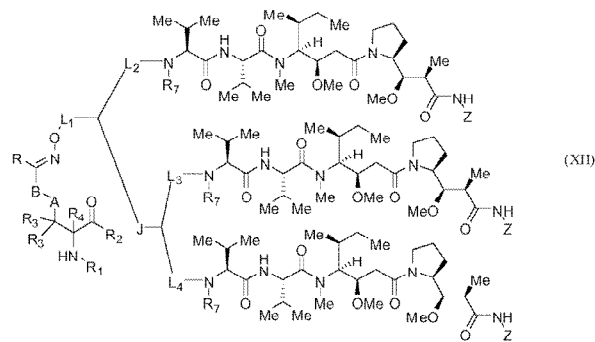
30

35



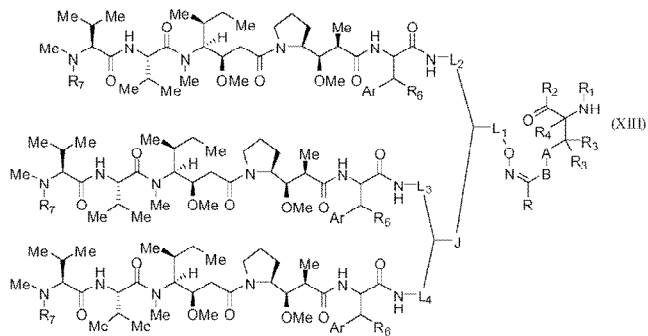
40

45



50

55



60

65

[0348] En otra realización de la presente invención, el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de fórmula (XXXVII) en solución acuosa bajo condiciones ligeramente ácidas.

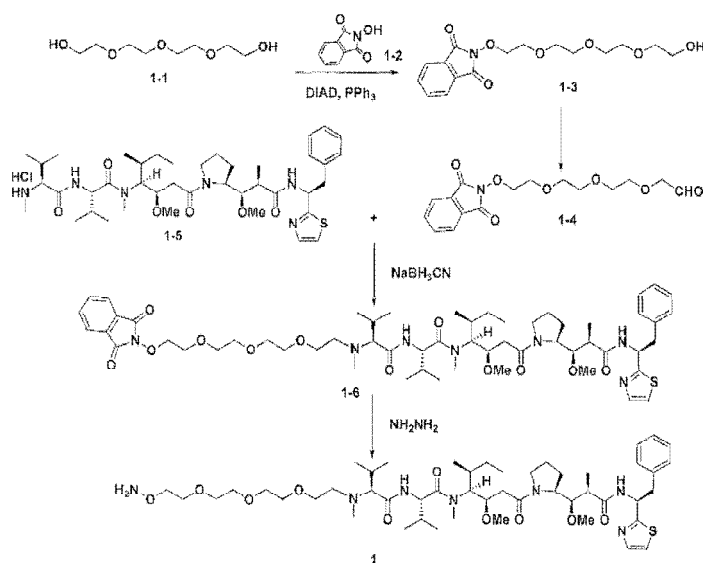
[0349] Cada una de estas formas de realización se proporcionan como ejemplos no limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1

[0350]

Esquema 1



[0351] **Compuesto 1-3:** Se disolvieron tetra (etilenglicol) **1-1** (10 g, 51,5 mmol), N-hidroxiftavalimida **1-2** (8,4 g, 51,15 mmol) y trifetilfosfina (17,6 g, 67 mmol) en 300 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (12,8 ml, 61,78 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,47 g (31%) del Compuesto **1-3**.

[0352] **Compuesto 1-4:** A una solución del Compuesto **1-3** (200 mg, 0,59 mmol) en 15 ml de diclorometano, se agregó Periodinano de Dess-Martin (300 mg, 0,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo con la solución de bisulfito de sodio en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 150 mg (75%) del Compuesto **1-4**.

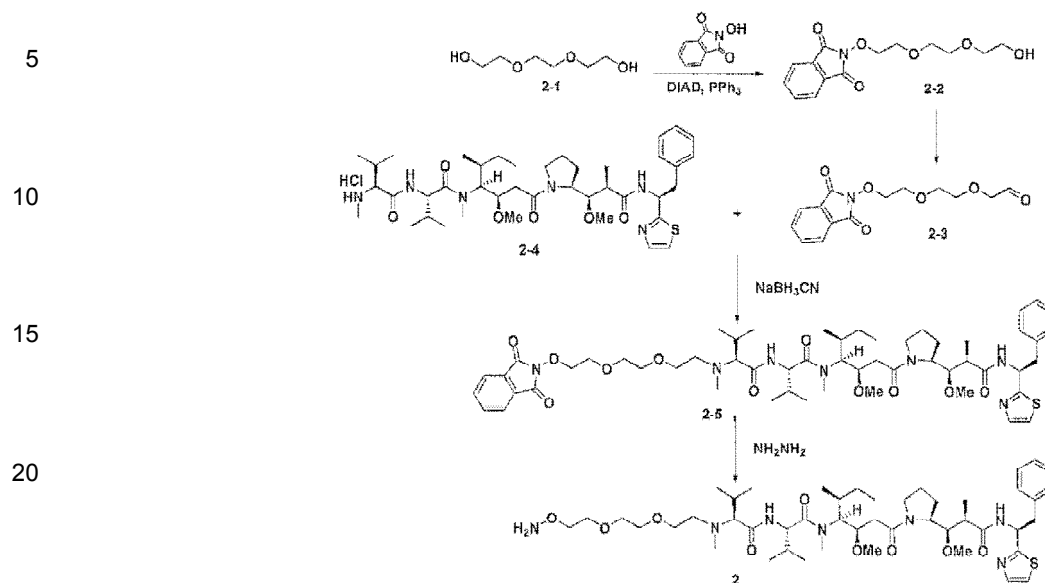
[0353] **Compuesto 1-6:** A una solución de sal de hidrócloruro de monometildolastatina **1-5** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 ml de DMF se agregó el Compuesto **1-4** (63 mg, 0,186 mmol) y 70 ml de ácido acético, seguido de adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del Compuesto **1-6**. EM (ESI) m/z 547 [M+2H], 1092 [M+H].
1d.

[0354] **Compuesto 1:** El Compuesto **1-6** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 32 ml de hidracina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del Compuesto **1**, MS (ESI) m/z 482 [M+2H], 962 [M+H].

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2

[0355]

Esquema 2

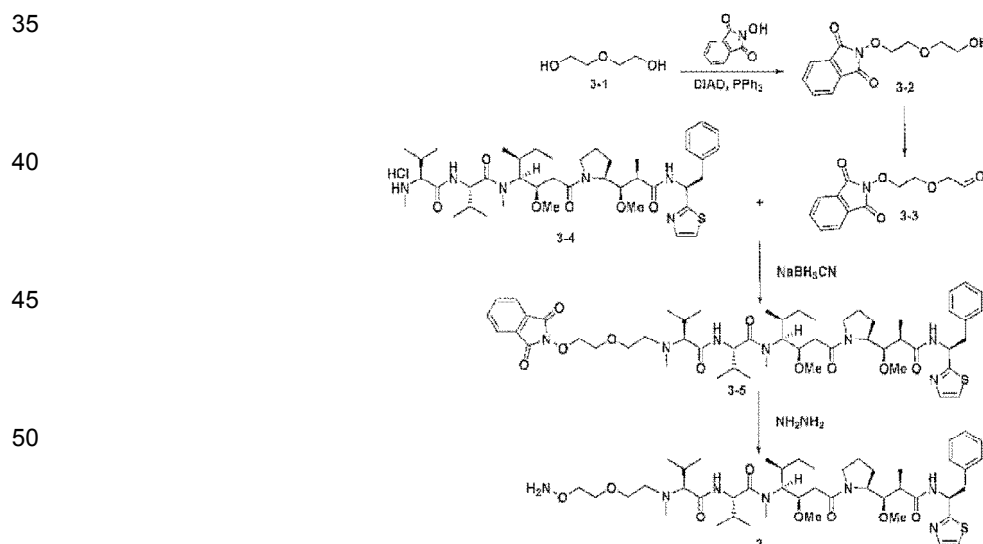


[0356] El compuesto 2 se sintetizó por una ruta sintética similar a la descrita en el Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 460 [M+2H], 918 [M+H].

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3

[0357]

Esquema 3



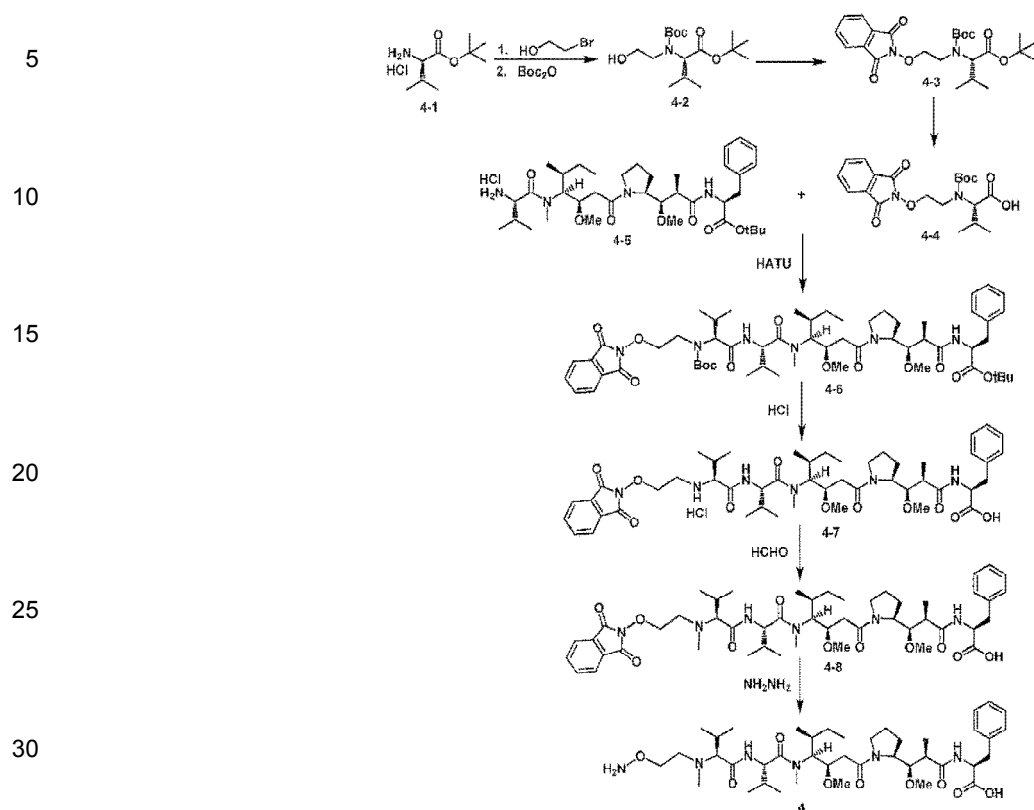
[0358] El compuesto 3 se sintetizó por una ruta sintética similar al Ejemplo 1, MS (ESI) m/z 438 [M+2H], 974 [M+H].

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 4

60 [0359] **Compuesto 4-2:** A una solución de Val (OtBu)-OH.HCl **4-1** (1 g, 4,77 mmol) y bromoetanol (304,7 μ L, 4,3 mmol) en 10 ml de DMF, se agregaron 1,68 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se añadieron 4,8 mmol de Boc₂O a la mezcla de reacción, seguido de 0,84 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 0,66 g del compuesto **4-2**.

65

Esquema 4



[0360] Compuesto 4-3: A una solución del compuesto **4-2** (500 mg, 1,58 mmol), se añadió N-hidroxiftalimida (261 mg, 1,6 mmol) y trifetilfosfina (538 mg, 2,05 mmol) en 15 ml de THF DIAD (394 μ L, 1,9 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 0,68 g del compuesto **4-3**.

[0361] Compuesto 4-4: El compuesto **4-3** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMF y se trató con Boc₂O (230 μ L, 1 mmol) y DIEA (352 μ L, 2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 100 mg del compuesto **4-4**.

[0362] Compuesto 4-5: A una solución de compuesto Boc-Val-Dil-metilDap-OH en DMF se agrega phe(OtBu)-OH.HCl, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **4-5**.

[0363] Compuesto 4-6: A la solución del compuesto **4-5** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash para dar el compuesto **4-6**.

[0364] Compuesto 4-7: El compuesto **4-6** se disuelve en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra al vacío para dar el compuesto **4-7**.

[0365] Compuesto 4-8: A una solución de compuesto **4-7** en 1 ml de DMF se le añade formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **4-8**.

[0366] Compuesto 4: el compuesto **4-8** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidracina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto 4.

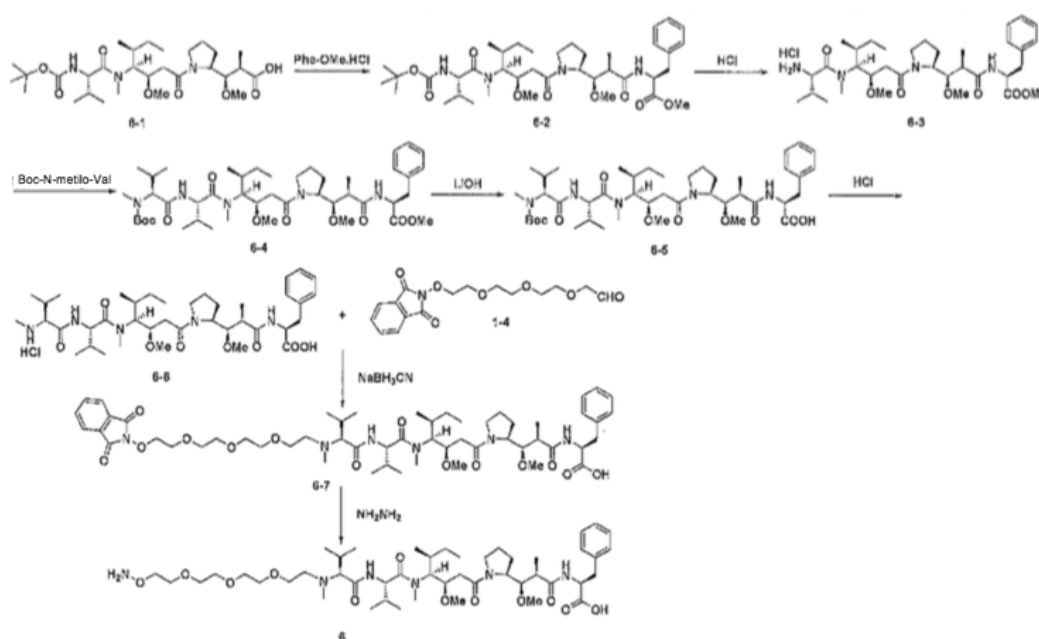
Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 5

[0367] El compuesto 4-7 se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidracina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto 5.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6

[0368]

Esquema 6



[0369] **Compuesto 6-2:** A una solución del compuesto 6-1 (500 mg, 0,875 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 283 mg de clorhidrato de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 560 mg (76%) del compuesto 6-2.

[0370] **Compuesto 6-3:** El compuesto 6-2 se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 511 mg del compuesto 6-3.

[0371] **Compuesto 6-4:** A una solución del compuesto 6-3 (368 mg, 0,55 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 255 mg de Boc-N-metilo valina, 314 mg de HATU y 303 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 370 mg (79%) del compuesto 6-4.

[0372] **Compuesto 6-5:** A una solución del compuesto 6-4 (170 mg) en 10 ml de MeOH, se agregaron 5 eq de LiOH 1N. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1NHCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 150 mg (90%) del compuesto 6-5.

[0373] **Compuesto 6-6:** El compuesto 6-5 se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg de compuesto 6-6.

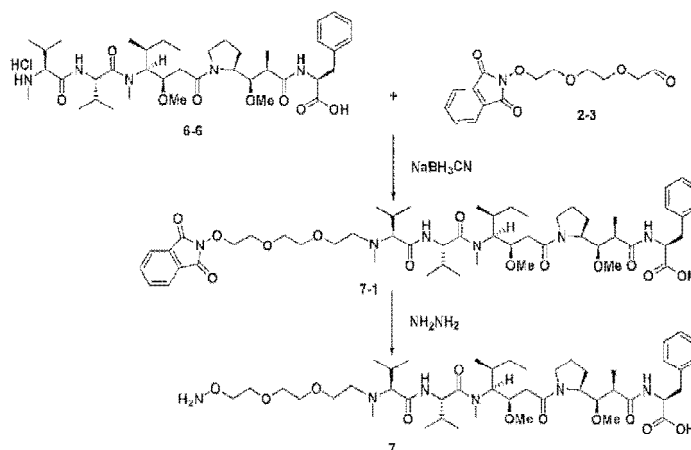
[0374] **Compuesto 6-7:** A una solución del compuesto 6-6 (50 mg, 0,062 mmol) en 1 ml de DMF se agregó el compuesto 1-4 (63 mg, 0,186 mmol) y 70 μl de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto 6-7.

[0375] Compuesto 6: El compuesto 6-7 (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 32 μ l de hidracina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del Compuesto 6.

5 **Ejemplo 7: Síntesis del Compuesto 7**

[0376]

10 Esquema 7

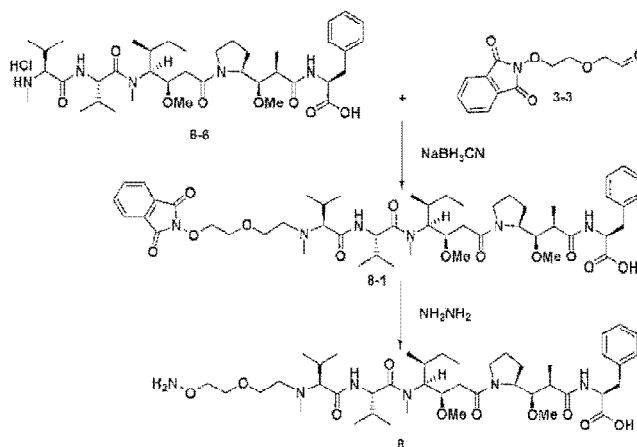


30 **[0377]** El compuesto 7 se sintetizó a través de una ruta sintética similar al Compuesto 1. MS (ESI) m/z 440 [M+2H], 879 [M+H].

Ejemplo 8: Síntesis del Compuesto 8

35 **[0378]**

40 Esquema 8



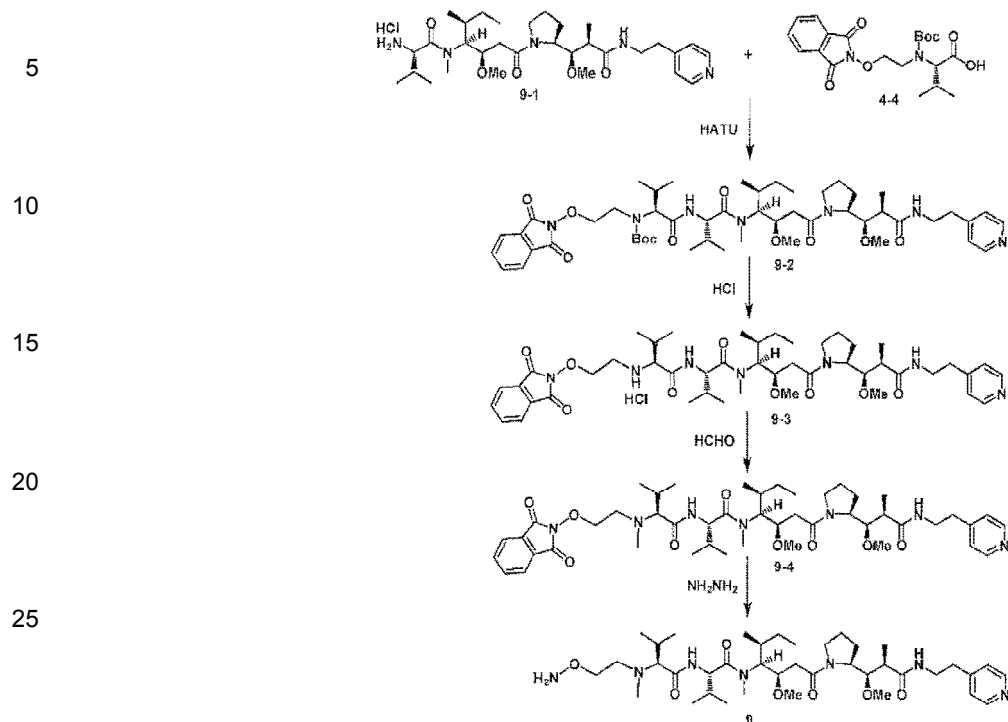
[0379] El compuesto 8 se sintetizó a través de una ruta sintética similar al Compuesto 1. MS (ESI) m/z 418 [M+2H], 835 [M+H].

60 **Ejemplo 9: Síntesis del Compuesto 9**

[0380]

65

Esquema 9



[0381] Compuesto 9-1: A una solución de compuesto Boc-Val-Dil-metilDap-OH en DMF se agrega 4-(2-aminoetil)piridina, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **9-1**.

[0382] Compuesto 9-2: A una solución del compuesto **9-1** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash para dar el compuesto **9-2**.

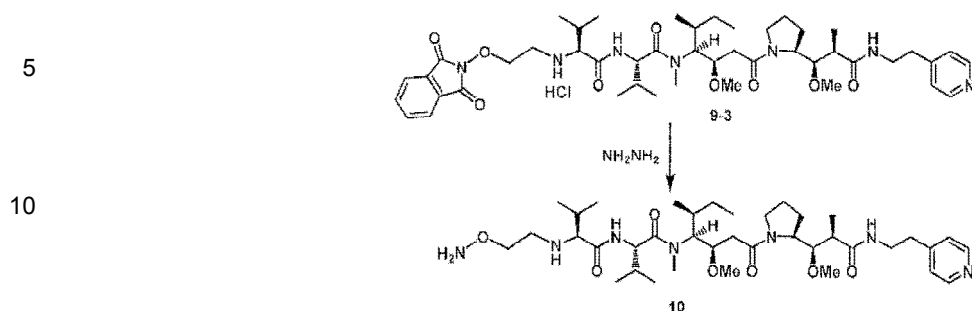
[0383] Compuesto 9-3: El compuesto **9-2** se disuelve en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra al vacío para dar el compuesto **9-3**.

[0384] Compuesto 9-4: A una solución de compuesto **9-3** en 1 ml de DMF se le agrega formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **9-4**.

[0385] Compuesto 9: El compuesto **9-4** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidracina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el compuesto **9**.

Ejemplo 10: Síntesis del Compuesto 10**[0386]**

Esquema 10

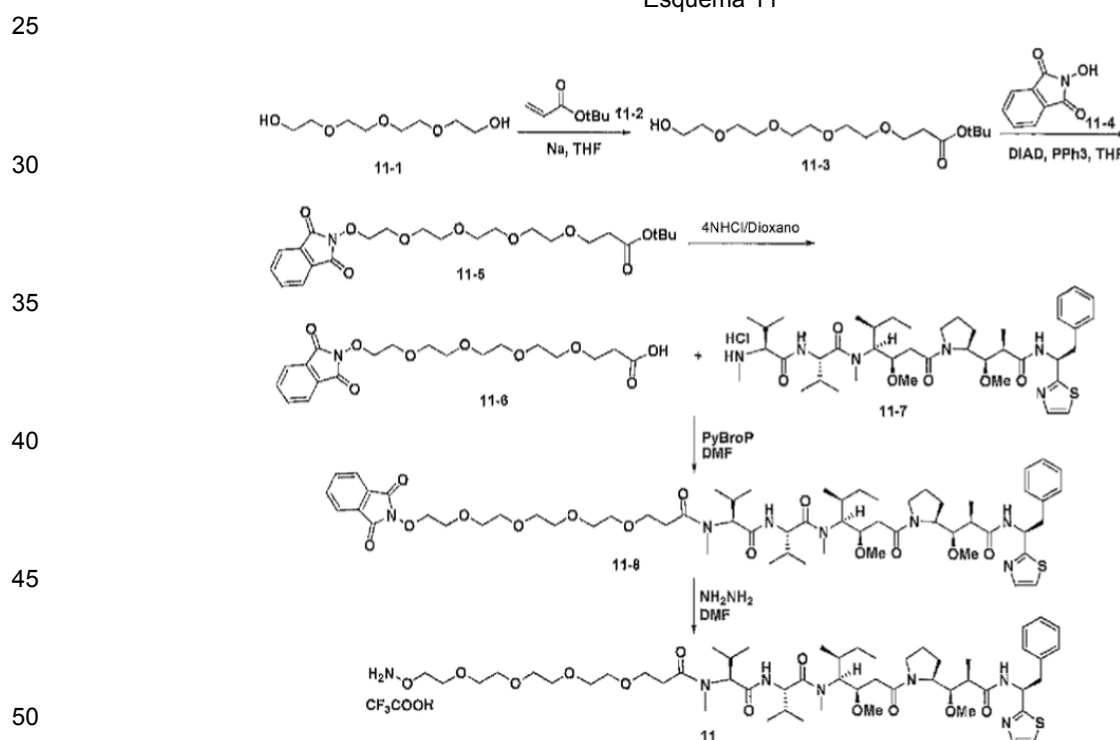


[0387] **Compuesto 10:** El compuesto **9-3** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidracina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Ejemplo **10**.

20 **Ejemplo 11: Síntesis del Compuesto 11**

[0388]

Esquema 11



[0389] **Compuesto 11-3:** A una solución de tetra (etilenglicol) **11-1** (40,6 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de acrilato de *tert*-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de HCl 1N. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 6,4 g (23%) del Compuesto **11-3**.

[0390] **Compuesto 11-5:** el Compuesto **11-3** (1,0 g, 3,12 mmol), la N-hidroxiptalimida **11-4** (611 mg, 3,744 mmol) y la trifetilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) se disolvieron en 20 ml de tetrahidrofurano seguido por adición de DIAD (0,84 ml, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del Compuesto **11-5**.

[0391] **Compuesto 11-6:** el Compuesto **11-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se

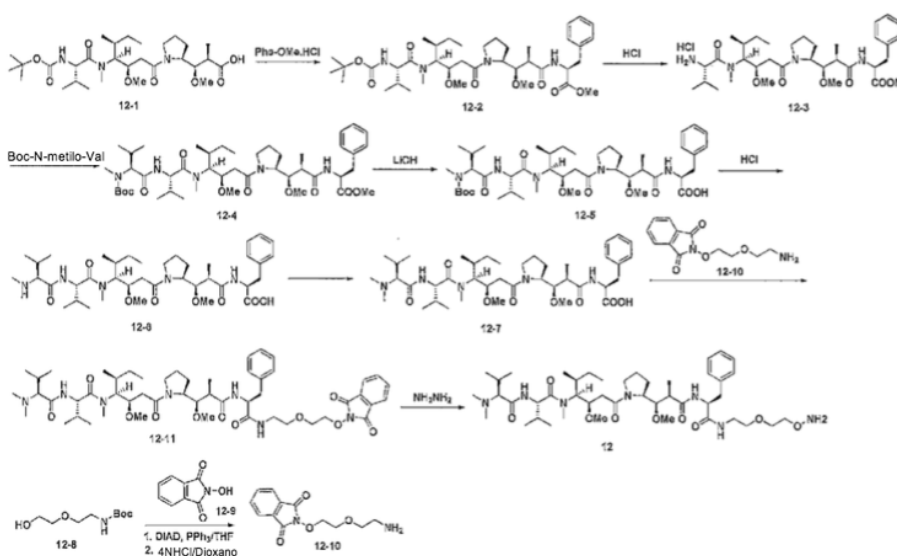
agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 1,0 g del Compuesto **11-6**.

[0392] Compuesto 11-8: A una solución de 30 mg (0,0372 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, 31 mg (0,0744 mmol) de Compuesto **11-6** y 38,2 mg (0,082 mmol) de PyBroP en 1 ml de DMF se agregó 33 μ L (0,186 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 28 mg (65%) del Compuesto **11-8**. EM (ESI) m/z 785 [M+2H], 1164 [M+H].

[0393] Compuesto 11: El Compuesto **11-8** (28 mg, 0,024 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 23 ml (0,72 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 20 mg (66%) del Compuesto **11**. MS (ESI) m/z 518 [M+2H], 1034 [M+H].

15 **Ejemplo 12: Síntesis del Compuesto 12**

[0394]



[0395] Compuesto 12-2: A una solución del Compuesto **12-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 ml de DMF, se agregaron 283 mg de clorhidrato de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 560 mg (76%) del Compuesto **12-2**.

[0396] Compuesto 12-3: El Compuesto **12-2** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 511 mg de Compuesto **12-3**.

[0397] Compuesto 12-4: A una solución de Compuesto **12-3** (368 mg, 0,55 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 255 mg de Boc-N-metilo valina, 314 mg de HATU y 303 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 370 mg (79%) del Compuesto **12-4**.

[0398] Compuesto 12-5: A una solución del Compuesto **12-4** (170 mg) en 10 ml de MeOH, se agregaron 5 eq de 1N LiOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1N HCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar 150 mg (90%) del Compuesto **12-5**.

[0399] Compuesto 12-6: El Compuesto **12-5** se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg de Compuesto **12-6**.

[0400] Compuesto 12-7: A una solución del Compuesto **12-6** en DMF se le añadió formaldehído (3 eq) y 20 eq de

ácido acético, seguido de la adición de 2 eq de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar el Compuesto **12-7**.

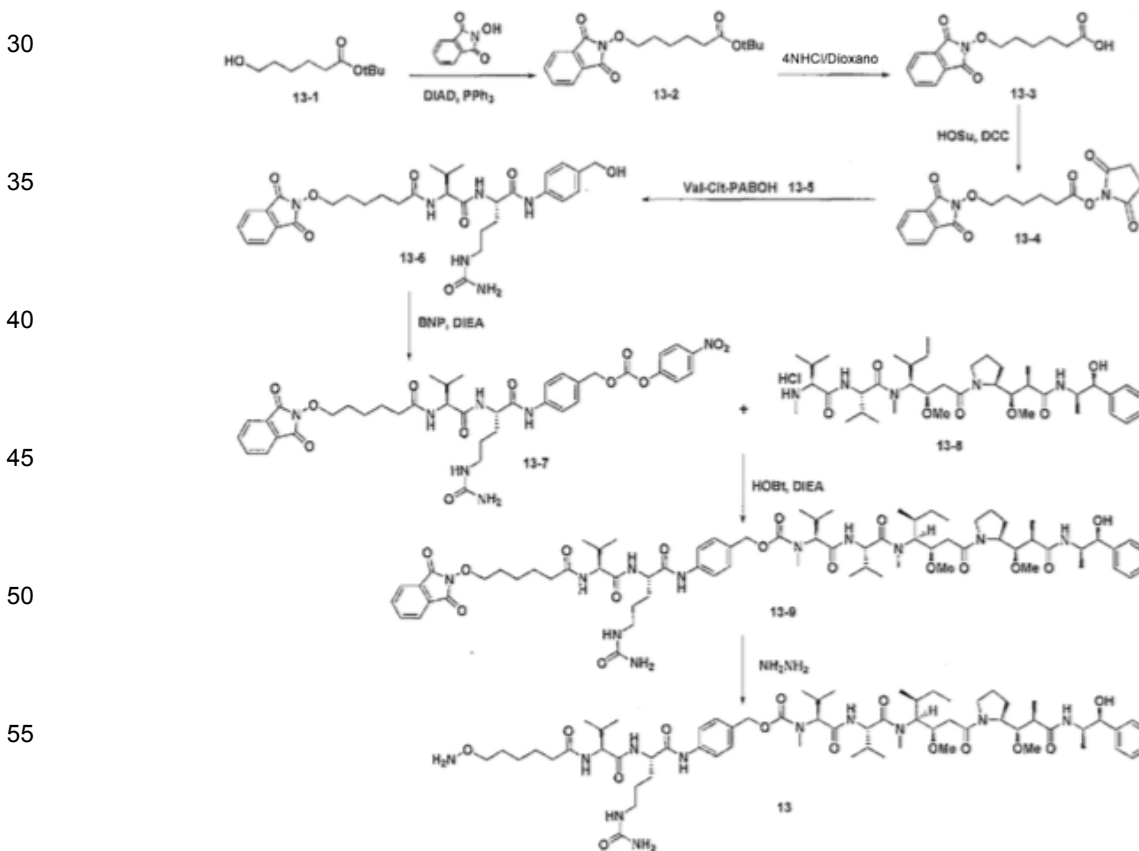
5 **[0401] Compuesto 12-10:** *tert*-Butilo 2-(2-hidroxietoxi) etilcarbamato (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxitfalmida (1,8 g, 11 mmol) y trifetilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 mL de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 mL, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para obtener 2,6 g (91%) de Compuesto **12-10**. MS (ESI) m/z 251 [M+H].

15 **[0402] Compuesto 12-11:** A una solución del Compuesto **12-10** (20 mg, 0,026 mmol) en 1 ml de DMF, se agregaron 11,2 mg del Compuesto **12-10**, 15 mg de HATU y 23 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 20 mg (70%) del Compuesto **12-4**, EM (ESI) m/z 490 [M+2H], 978 [M+H].

20 **[0403] Compuesto 12:** El Compuesto **12-11** (20 mg, 0,0183 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadió 18 μ L (0,56 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 14 mg (72%) del Compuesto **12**. MS (ESI) m/z 425 [M+2H], 848 [M+H].

Ejemplo 13: Síntesis del Compuesto 13

25 **[0404]**



65 **[0405] Compuesto 13-2:** 6-Hidroxihexanoato de *tert*-butilo **13-1** (1,5 g, 1,97 mmol), N-hidroxitfavalimida (1,42 g, 8,76 mmol) y trifetilfosfina (2,82 g, 10,76 mmol) se disolvieron en 50 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2 ml, 9,564 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 2,5 g (95%) del Compuesto **13-2**.

[0406] Compuesto 13-3: El Compuesto **13-2** se trató con 15 ml de 4N HCl en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se concentró a sequedad a vacío para dar 900 mg (100%) del Compuesto **13-3**.

5 **[0407] Compuesto 13-4:** A una solución del Compuesto **13-3** (900 mg, 3,0 mmol) en 10 ml de THF se agregaron 397 mg de N-hidroxisuccinimida, seguido de la adición de 669 mg de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se trató con 10 ml de DCM. La solución de DCM se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía flash en columna para dar 800 mg (71%) del Compuesto **13-4**.

10 **[0408] Compuesto 13-6:** La mezcla del Compuesto **13-4** (435 mg, 1,16 mmol) y Val-Cit-PABOH 13-5 1 (400 mg, 1,054 mmol) en 12 ml de DMF se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró y se lavó con éter. El sólido se secó al vacío para dar 660 mg (98%) del Compuesto **13-6**.

15 **[0409] Compuesto 13-7:** A la solución del Compuesto **13-6** (200 mg, 0,313 mmol) en 6 ml de DMF se le añadió carbonato de Bis-(p-nitrofenilo) (286 mg, 0,94 mmol), seguido de la adición de 110,2 μ L de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se concentró. El residuo se trató con éter y se filtró. El sólido recogido se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó al vacío para dar 210 mg (83%) del Compuesto **13-7**.

20 **[0410] Compuesto 13-9:** A una solución de sal de clorhidrato de monometilauristatina **13-8** (100 mg, 0,1325 mmol) en 2 ml de DMF se añadió el compuesto **13-7** (159 mg, 0,2 mmol) y 10 mg de HOBt, seguido de la adición de 35,2 μ L de DIEA. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 93 mg (51%) del compuesto **13-9**. MS (ESI) m/z 692 [M+2H], 1382 [M+H].

25 **[0411] Compuesto 13:** El Compuesto **13-9** (50 mg, 0,036 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 23 ml de hidracina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 32 mg (65%) del Compuesto **13**. MS (ESI) m/z 638,5 [M+Na+2H], 1253,3 [M+H], 1275,8 [M+Na].

Ejemplo 14: Síntesis del Compuesto 14

35 **[0412]**

40

45

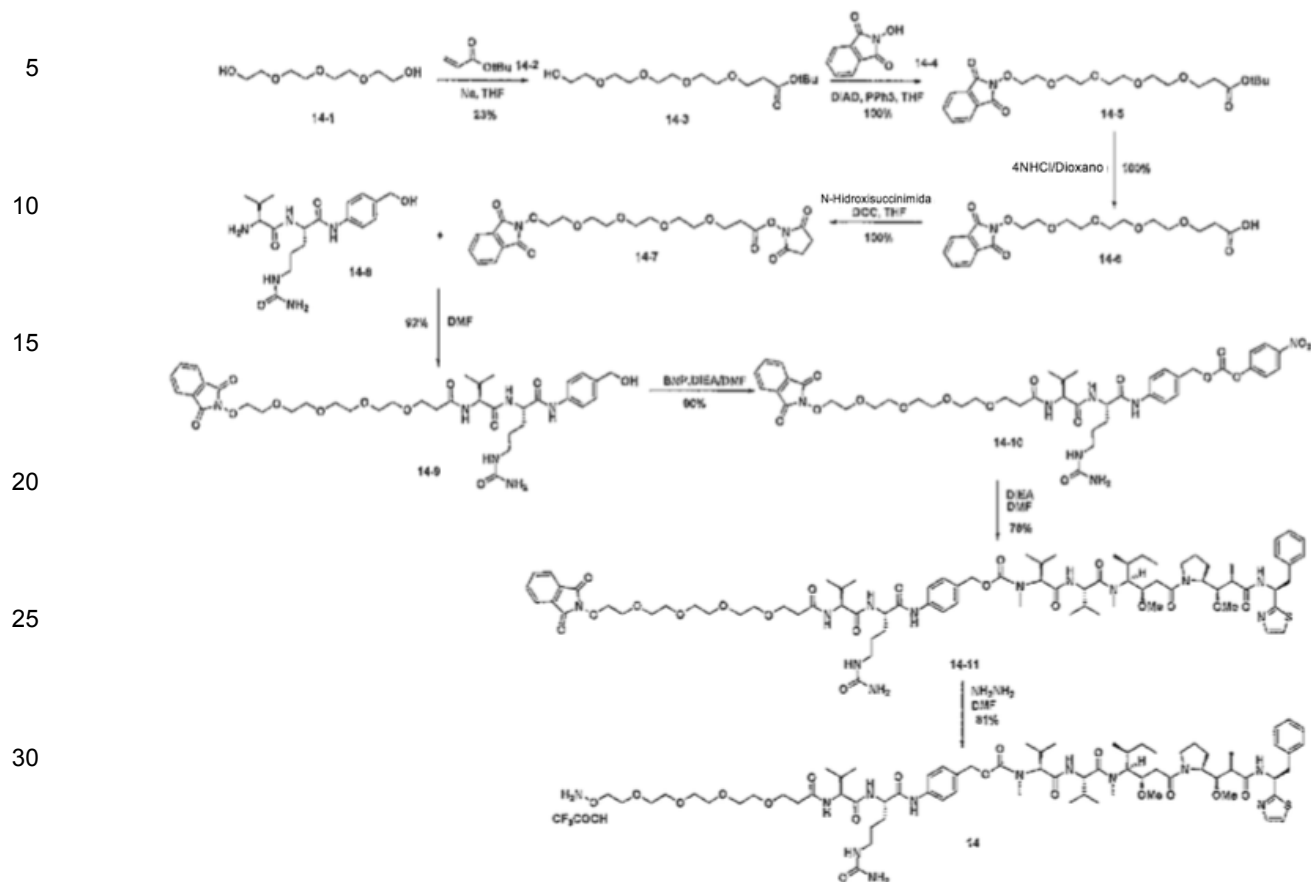
50

55

60

65

Esquema 14



[0413] Compuesto 14-3: A una solución de tetra (etilenglicol) **14-1** (40,6 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de *tert*-butilacrilato después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar 6,4 g (23%) del compuesto **14-3**.

[0414] Compuesto 14-5: El Compuesto **14-3** (1,0 g, 3,12 mmol), la N-hidroxitualimida **14-4** (611 mg, 3,744 mmol) y la trifetilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) se disolvieron en 20 ml de tetrahidrofurano seguido por adición de DIAD (0,84 ml, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del compuesto **14-5**.

[0415] Compuesto 14-6: El Compuesto **14-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 1,0 g del compuesto **14-6**.

[0416] Compuesto 14-7: A una solución del compuesto **6** (1,93 g, 4,68 mmol) y N-hidroxisuccinimida (646 mg, 5,616 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano, se agregaron 1,062 g (5,148 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos para dar 2,37 g (100%) del compuesto **14-7**.

[0417] Compuesto 14-8: El Compuesto **14-8** se realizó según la bibliografía (Bioconjugat Chem 2002, 13 (4), 855-869.).

[0418] Compuesto 14-9: A una solución del Compuesto **14-8** (200 mg, 0,527 mmol) en 2 ml de DMF se añadieron 295 mg (0,58 mmol) del Compuesto **14-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 402 mg (98%) del Compuesto **14-9**.

[0419] **Compuesto 14-10:** A una solución del Compuesto **14-9** (406 mg, 0,527 mmol) y bis-(p-nitrofenol) carbonato (481 mg, 1,58 mmol) en 10 ml de DMF se añadió 0,186 ml (1,054 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 350 mg (72%) del Compuesto **14-10**.

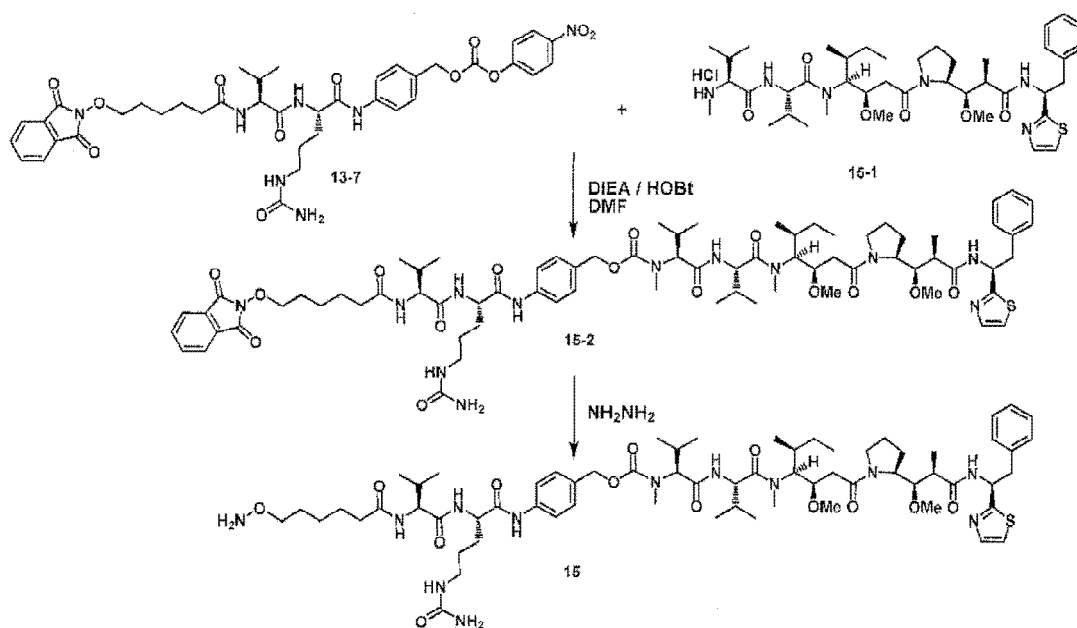
[0420] **Compuesto 14-11:** A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, se agregaron 87,2 mg (0,093 mmol) de Compuesto **14-10** y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 ml de DMF 22 μ L (0,124 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del Compuesto **14-11**, MS (ESI) m/z 785 [M+2H].

[0421] **Compuesto 14:** El Compuesto **14-11** (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadió 17 μ L (0,52 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 22 mg (58%) del Compuesto **14**. MS (ESI) m/z 720 [M+2H].

Ejemplo 15: Síntesis del Compuesto 15

[0422]

Esquema 15



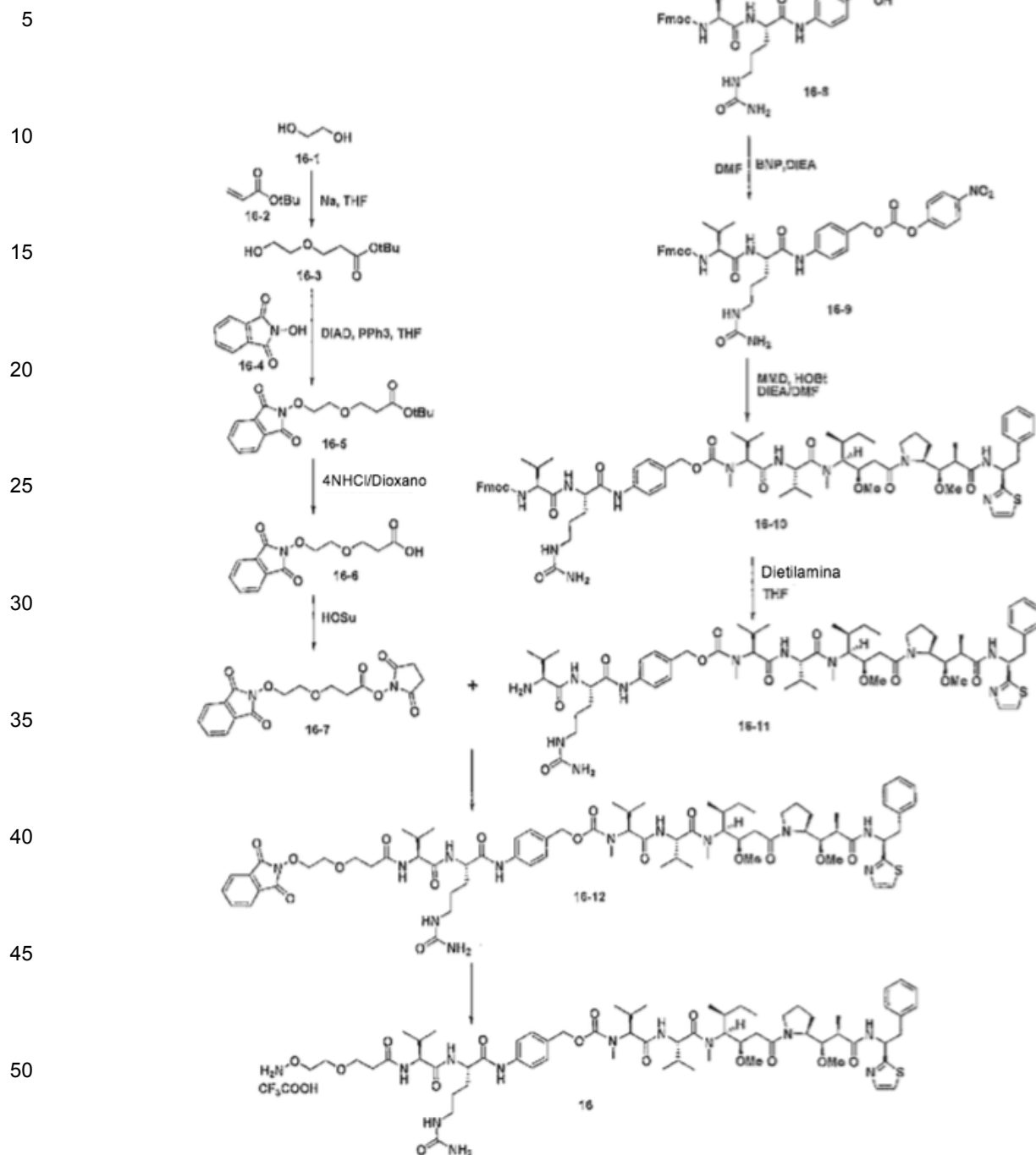
[0423] **Compuesto 15-2:** A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, se agregaron 75 mg (0,093 mmol) de Compuesto **13-7** y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 ml de DMF 22 μ L (0,124 mmol) de diiso-propiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del Compuesto **15-2**. MS (ESI) m/z 718 [M+2H], 1435 [M+H].

[0424] **Compuesto 15-2:** el Compuesto **15-2** (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadió 17 μ L (0,52 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 22 mg (58%) del ejemplo **15**. MS (ESI) m/z 653 [M+2H], 1305 [M+H].

Ejemplo 16: Síntesis del Compuesto 16

[0425]

Esquema 16



[0426] Compuesto 16-3: A una solución de etilenglicol 16-1 (13,1 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de acrilato de *tert*-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,2 g (24%) del Compuesto 16-3.

[0427] Compuesto 16-5: El Compuesto 16-3 (2,0 g, 10,5 mmol), N-hidroxifitalimida (2,05 g, 12,6 mmol) y trifenilfosfina (3,58 g, 13,65 mmol) se disolvieron en 50 ml de tetrahidrofurano seguido de adición de DIAD (3,26 mL, 15,75 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar el Compuesto 16-5.

[0428] **Compuesto 16-6:** El Compuesto **16-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar el Compuesto **16-6**.

5 [0429] **Compuesto 16-7:** A una solución del Compuesto **16-6** (5,16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (722 mg, 6,7 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano se añadieron 1,28 g (6,2 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía flash en columna para dar 500 mg de Compuesto **16-7**.

10 [0430] **Compuesto 16-8:** El Compuesto **16-8** se realizó según la bibliografía (Bioconjugat Chem 2002, 13 (4), 855-869.).

15 [0431] **Compuesto 16-9:** A una solución de Compuesto **16-8** (5,0 g, 8,3 mmol) y carbonato de Bis-(p-nitrofenol) (7,6 g, 25 mmol) en 100 ml de DMF se agregaron 2,92 ml (16,6 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 5,0 g (81%) del Compuesto **16-9**.

20 [0432] **Compuesto 16-10:** A una solución de 1,0 g (1,24 mmol) de clorhidrato de monometildolastatina, se agregaron 1,42 g (1,8575 mmol) del Compuesto **16-9** y 95 mg (0,62 mmol) de HOBt en 10 mL de DMF 437 μ L (2,48 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 1,0 g (58%) del Compuesto **16-10**, MS (ESI) m/z 700 [M+2H], 1398 [M+H].

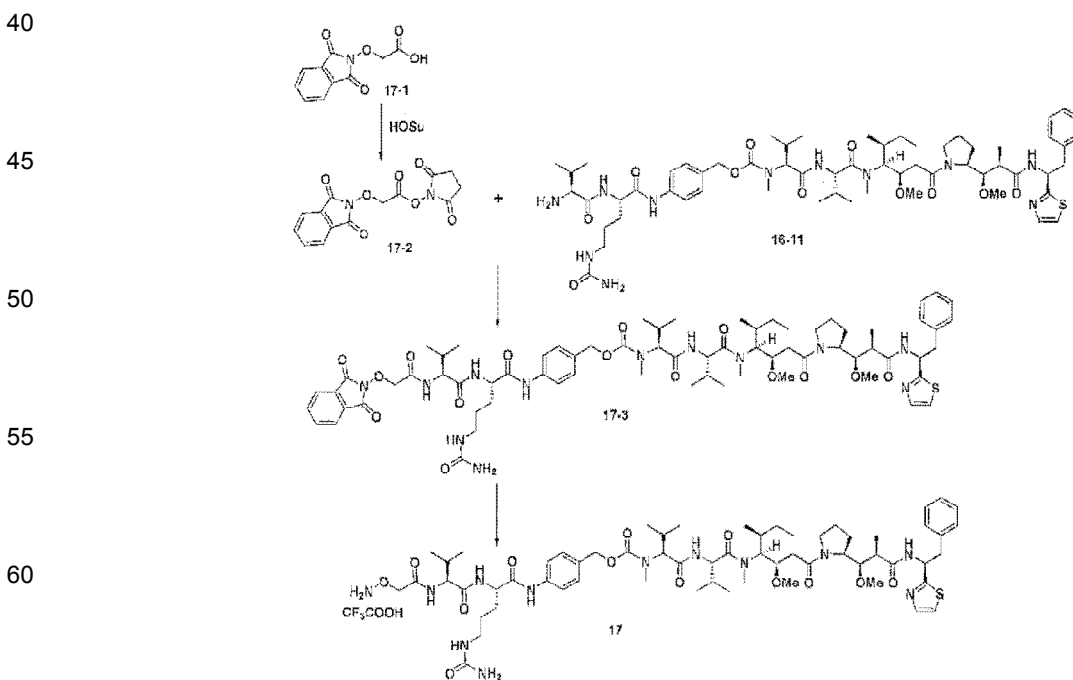
25 [0433] **Compuesto 16-11:** A una solución del Compuesto **16-10** (1,0 g, 0,715 mmol) en 15 ml de tetraedrofurano, se agregaron 5 ml (48 mmol) de dietilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 20 ml de DCM, se trató con 200 ml de éter y se filtró, se secó con éter y se secó al vacío para dar 860 mg del Compuesto **16-11**. MS (ESI) m/z 589 [M+2H], 1176 [M+H].

30 [0434] **Compuesto 16:** A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del Compuesto **16-11** en 1 ml de DMF se agregaron 32 mg (0,085 mmol) del Compuesto **16-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron reacción realizada. Se añadieron 27,2 μ L (0,85 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1 N HCl y se purificó por HPLC para dar 40 mg (66%) del Compuesto **16**. MS (ESI) m/z 654 [M+2H], 1307 [M+H].

Ejemplo 17: Síntesis del Compuesto 17

35 [0435]

Esquema 17



[0436] **Compuesto 17-2:** A una solución del Compuesto **17-1** (1,0 g, 4,52 mmol) y N-hidroxisuccinimida (572 mg,

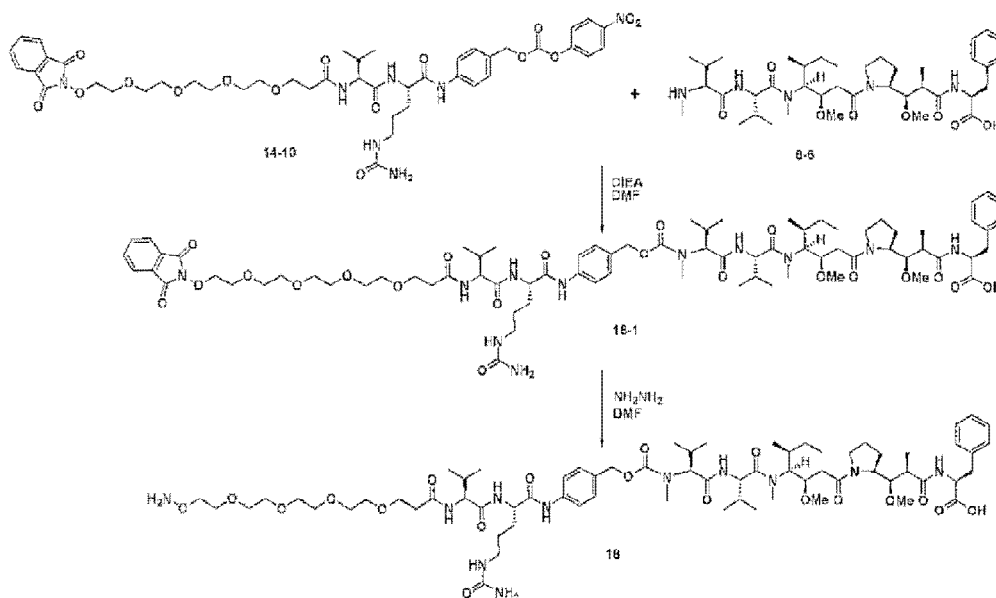
4,97 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano se agregaron 1,12 g (5,424 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtra. La filtración se concentró para dar el Compuesto **17-2**.

[0437] Compuesto 17: A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del Compuesto **16-11** en 1 ml de DMF, se agregaron 41 mg (0,1275 mmol) del Compuesto **17-2**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron reacción realizada. Se añadieron 20 ml (0,625 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1 N HCl y se purificó por HPLC para dar 35 mg (60%) del Compuesto **17**. MS (ESI) m/z 625 [M+2H], 1249 [M+H].

Ejemplo 18: Síntesis del Compuesto 18

[0438]

Esquema 18

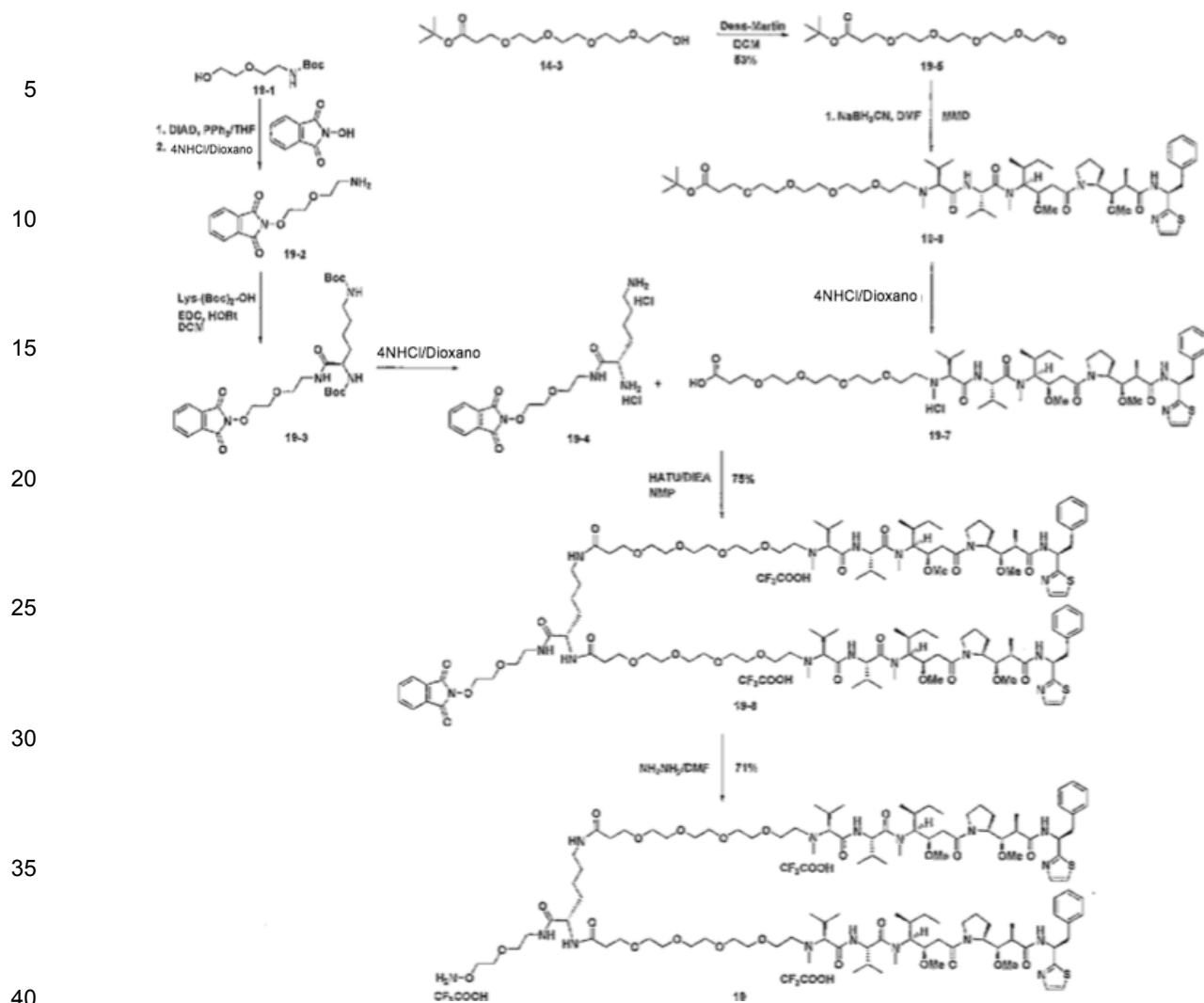


[0439] Compuesto 18-1: A una solución del compuesto **6-6**, mg (0,062 mmol) del Compuesto **14-10** y HOBt en 1 ml de DMF se le añadió diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar el Compuesto **18-1**.

[0440] Compuesto 18: el Compuesto 18-1 se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadió hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar el Compuesto 18.

Ejemplo 19: Síntesis del Compuesto 19

[0441]



[0442] **Compuesto 19-2:** *tert*-Butilo 2-(2-hidroxi-etoxi)etilcarbamato de 13 (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxi-fitalimida (1,8 g, 11 mmol) y trifenilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 ml de tetrahydrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 ml, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para obtener 2,6 g (91%) de Compuesto **19-2**. MS (ESI) *m/z* 251 [M+H].

[0443] **Compuesto 19-3:** A la mezcla del Compuesto **19-2** (315 mg, 1,1 mmol), Boc-Lys (Boc)-OH (365 mg, 1 mmol), EDC (382 mg, 2 mmol) y HOBt (306 mg, 2 mmol) en 10 ml de DCM se agregaron 1,056 ml (6 mmol) de diisopropil-etilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con ácido cítrico al 5%, se saturó con bicarbonato de sodio, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna instantánea utilizando Cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos, para dar 405 mg (70%) de Compuesto **19-3**.

[0444] **Compuesto 19-4:** El Compuesto **19-3** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 315 mg (98%) del Compuesto **19-4**, MS (ESI) *m/z* 379 [M+H].

[0445] **Compuesto 19-5:** A una solución de Compuesto **14-3** (322 mg, 1 mmol) en 20 ml diclorometano se añadió Periodinano de Dess-Martin (636 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se detuvo con una solución de tiosulfato de sodio (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna flash usando cartuchos de SiliaSep (40 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos para dar 170 mg (53%)

del Compuesto **19-5**.

[0446] Compuesto 19-6: A una solución de clorhidrato de monometildolastatina, 1,0 g (1,24 mmol) en 20 ml de DMF se agregaron 1,19 g (3,72 mmol) del Compuesto 17 seguido de 1,4 ml (24,8 mmol) de ácido acético y 156 mg (2,48 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se ajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con metanol al 0-5%/DCM para dar 680 mg (51%) del Compuesto **19-6**, MS (ESI) m/z 538 [M+2H], 1075 [M+H].

[0447] Compuesto 19-7: A una solución del Compuesto **19-6** (680 mg, 0,632 mmol) en 5 ml de DCM se agregaron 20 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 660 mg (98%) del Compuesto **19-7**. MS (ESI) m/z 510 [M+2H], 1019 [M+H].

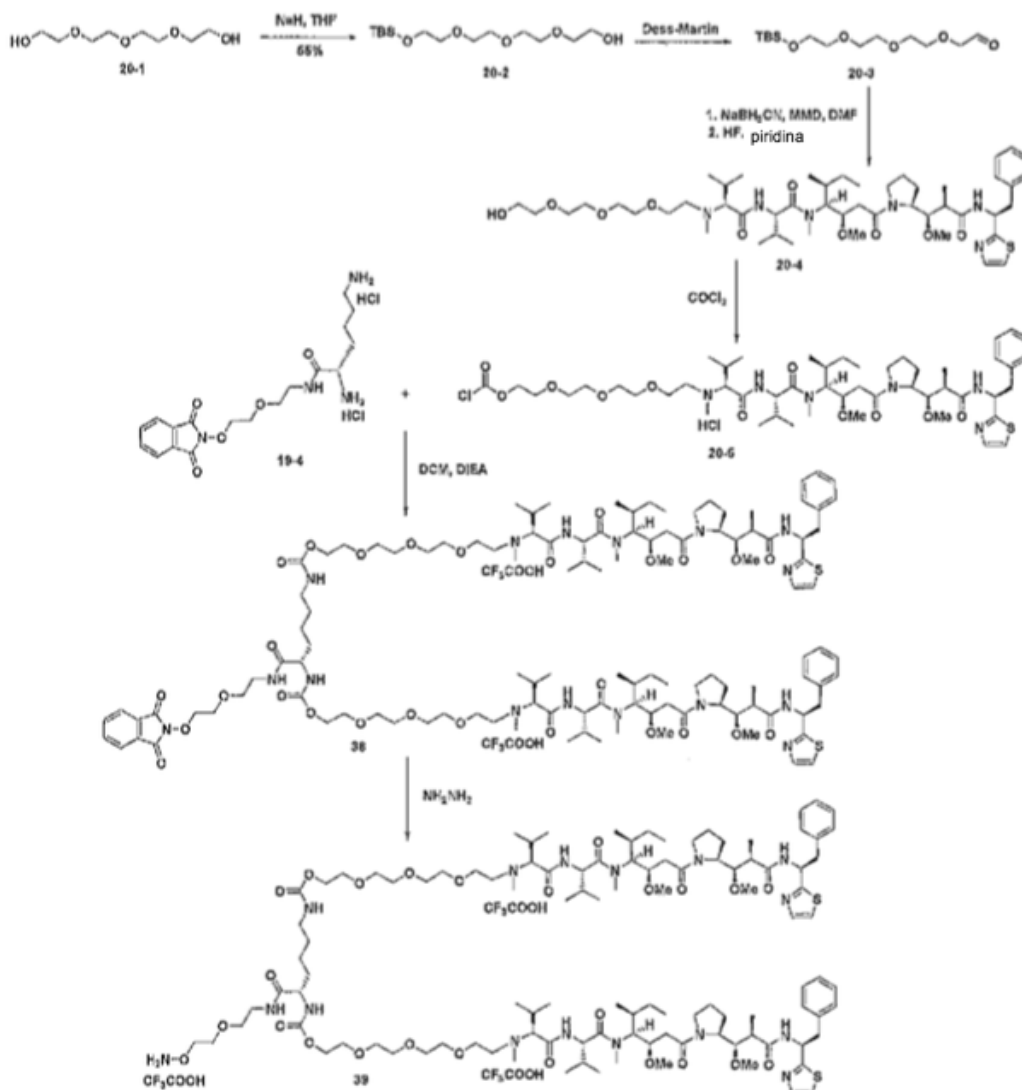
[0448] Compuesto 19-8: A una solución del Compuesto **19-7** (280 mg, 0,257 mmol), Compuesto **19-4** (38 mg, 0,0857 mmol) y N-metilmorfolina (0,283 ml, 2,57 mmol) en 5 ml de N-metilpirrolidinona se añadió 98 mg (0,257 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 160 mg (71%) del Compuesto **19-8**. MS (ESI) m/z 596 [M+4H], 794 [M+3H], 1191 [M+2H].

[0449] Compuesto 19: El Compuesto **19-8** (160 mg, 0,0613 mmol) se disolvió en 1,5 ml de DMF. Se añadió 20 μ L (0,613 mmol) de hidrazina anhidra, la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de clorhidrato 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 120 mg (75%) del Compuesto **19**. MS (ESI) m/z 451 [M+5H], 563 [M+4H], 751 [M+3H], 1126 [M+2H].

Ejemplo 20: Síntesis del Compuesto 20

[0450]

5
10
15
20
25
30
35
40



[0451] **Compuesto 20-2:** A una solución de tetra (etilenglicol) **20-1** (8,0 g, 41,2 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 1,65 g de hidruro de sodio a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 6,21 g de TBS-Cl a esta solución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 1, 50 ml x 2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,7 g de compuesto **20-2**.

[0452] **Compuesto 20-3:** A una solución de compuesto **20-2** (500 mg, 1,62 mmol) en 30 ml de diclorometano se le añadió Periodinano de Dess-Martin (1,03 g, 2,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se detuvo con una solución de tiosulfato de sodio (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 400 mg de compuesto **20-3**.

[0453] **Compuesto 20-4:** A una solución de clorhidrato de monometildolastatina, 213 mg (0,263 mmol) en 4 ml de DMF, se agregaron 245 mg (0,75 mmol) del compuesto **20-3** seguido de 0,303 ml (5 mmol) de ácido acético y 34 mg (0,5 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. Se añadieron 3 ml de acetonitrilo al 60%, seguido de 0,2 ml de piridina HF a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente orgánico se eliminó al vacío. El residuo se ajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 160 mg de compuesto **20-4**. MS (ESI) *m/z* 474 [M+2H], 947 [M+H].

[0454] Compuesto 20-5: A una solución del compuesto **20-4** (50 mg, 0,062 mmol) en 4 ml de DCM, se agregaron 0,3 ml de foseno/tolueno a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 3 horas y se concentró al vacío para la siguiente etapa sin purificación,

5 **[0455] Compuesto 20-6:** A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol) y compuesto **20-5** (0,062 mmol) se añadieron 25 ml de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 33 mg del compuesto **20-6**. MS (ESI) *m/z* 582 [M+4H], 775 [M+3H], 1163 [M+2H].

10 **[0456] Compuesto 20:** El compuesto **20-6** (33 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 14 µL (0,43 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 10 mg del compuesto **20**. MS (ESI) *m/z* 549 [M+4H], 732 [M+3H], 1098 [M+2H].

15

Ejemplo 21: Síntesis del Compuesto 21

[0457]

20

25

30

35

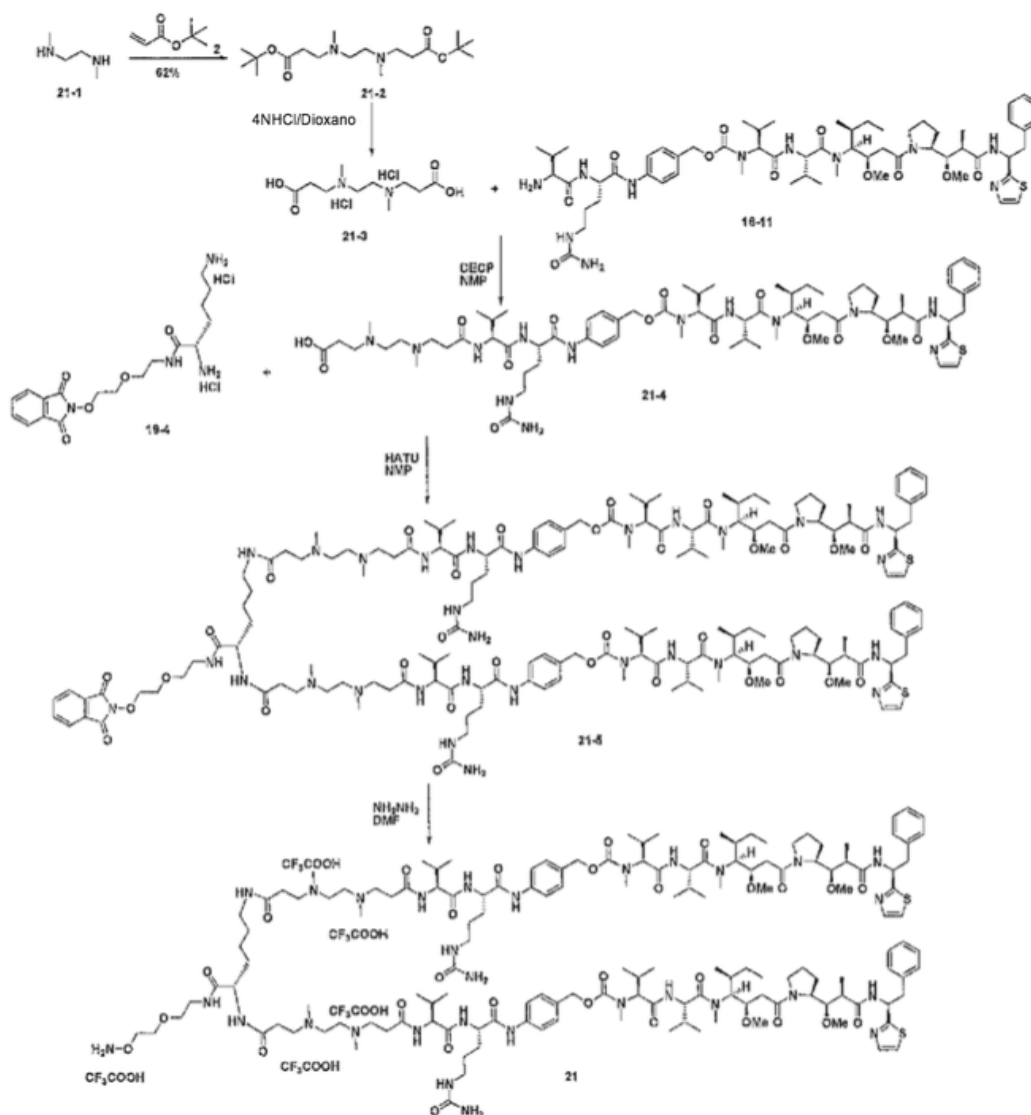
40

45

50

55

60



65 **[0458] Compuesto 21-2:** La mezcla de N,N'-dimetiletilendiamina **21-1** (5 ml, 46,5 mmol) y acrilato de *tert*-butilo 13 ml (116 mmol) se calentó a 85°C durante 1 hora. Se agregaron otros 13 ml (116 mmol) de acrilato de *tert*-butilo. La mezcla de reacción se calentó de manera continua a 85°C durante 1 hora y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se diluyó con hexanos y se purificó por

cromatografía en columna flash utilizando cartuchos SiliaSep (120 g), eluyendo con metanol al 0-5%/DCM para dar 10,1 g (62%) del compuesto **21-2**. MS (ESI) m/z 345 [M+H].

5 **[0459] Compuesto 21-3:** A una solución del compuesto **21-2** (5,0 g, 14,5 mmol) en 50 ml de DCM, se agregaron 40 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 4,3 g (97%) del compuesto **21-3**.

10 **[0460] Compuesto 21-4:** A una solución de 166 mg (0,544 mmol) de compuesto **21-3** y 0,15 mL de N-metilmorfolina en 10 mL de N-metilpirrolidiona se agregaron 160 mg de Compuesto **16-11**, seguido de 0,068. mL (0,408 mmol) de DECP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un 35-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 100 mg (50%) del compuesto **21-4**, MS (ESI) m/z 464 [M+3H], 696 [M+2H], 1391 [M+H].

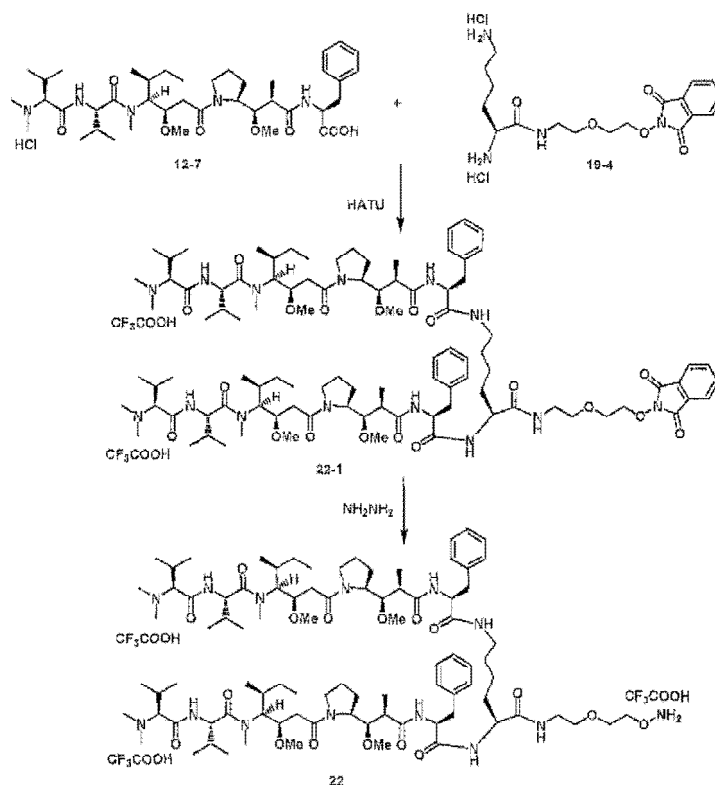
15 **[0461] Compuesto 21-5:** A una solución del Compuesto **19-4** (11 mg, 0,025 mmol), el compuesto **21-4** (115 mg, 0,077 mmol) y N-metilmorfolina (0,028 ml, 0,25 mmol) en 1,5 ml de N-metilpirrolidiona se añadió 29,3 mg (0,077 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 60 mg (67%) del compuesto **21-5**, MS (ESI) m/z 625 [M+5H], 781 [M+4H], 1041 [M+3H].

20 **[0462] Compuesto 21:** El compuesto **21-5** (60 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 7 μ L (0,21 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 29 mg (58%) del compuesto **21**. MS (ESI) m/z 599 [M+5H], 749 [M+4H], 998 [M+3H].

Ejemplo 22: Síntesis del Compuesto 22

30 **[0463]**

Esquema 22



65 **[0464] Compuesto 22-1:** A una solución del Compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol), el Compuesto **12-7** (40 mg, 0,051 mmol) y DIEA (0,030 mL, 0,17 mmol) en 2 mL de DMF se agregaron 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo

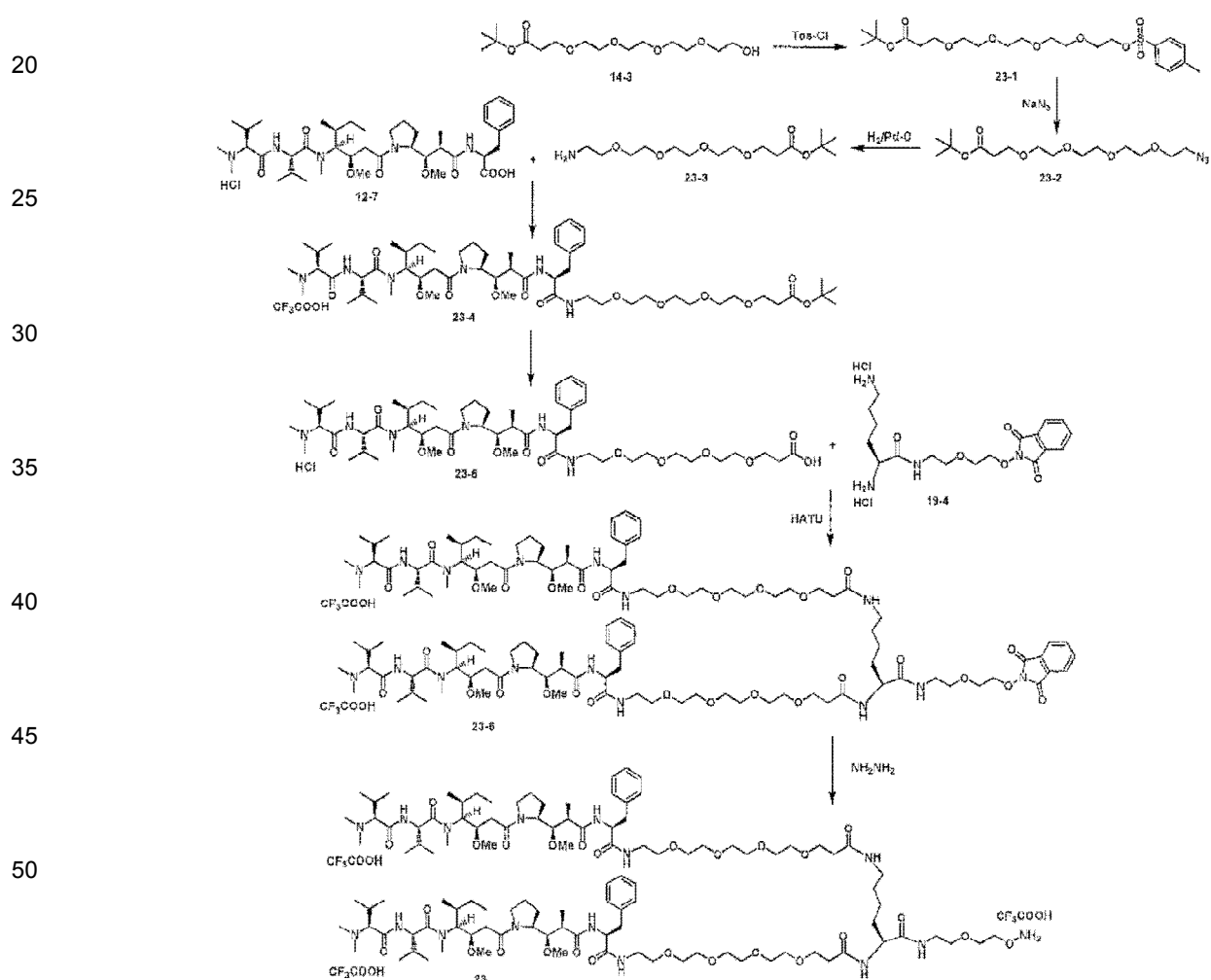
con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 24 mg (68%) del compuesto **22-1**. MS (ESI) *m/z* 612 [M+3H], 917 [M+2H], 1834 [M+H].

5 **[0465] Compuesto 22:** El compuesto **22-1** (24 mg, 0,012 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se agregaron 12 ml (0,36 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 15 mg (58%) del Ejemplo 21, MS (ESI) *m/z* 569 [M+3H], 852 [M+2H], 1726 [M+2H].

10 **Ejemplo 23: Síntesis del Compuesto 23**

[0466]

15 Esquema 23



60 **[0467] Compuesto 23-1:** A una solución de Compuesto **14-3** (4,0 g, 12,4 mmol) y 6,6 mL (37,2 mmol) de DIEA en 50 mL de DCM se agregaron 3,31 g de cloruro de toluensulfonilo a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se combinó y se lavó con ácido cítrico al 5%, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna flash para dar 3,5 g del compuesto **23-1**.

65 **[0468] Compuesto 23-2:** A una solución de compuesto **23-1** (3,5 g, 7,34 mmol) en 20 mL de DMF se le añadió azida de sodio (1,44 g, 22,02 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 2,1 g del compuesto **23-2**.

[0469] **Compuesto 23-3:** A una solución del compuesto **23-2** (2,1 g, 6,05 mmol) en 50 ml de MeOH, se agregaron 400 mg (10%) de Pd-C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo 1 atm H₂ durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró al vacío para dar 2,1 g del compuesto **23-3**, MS (ESI) *m/z* 322 [M+H].

5 [0470] **Compuesto 23-4:** A una solución de compuesto **23-3** (33 mg, 0,102 mmol), Compuesto **12-7** (40 mg, 0,051 mmol) y 54 ml de diisopropiltilamina en 1 ml de DMF, se agregaron 38 mg de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 52 mg del compuesto **23-4**. MS (ESI) *m/z* 525 [M+2H], 1049 [M+H].

10 [0471] **Compuesto 23-5:** El compuesto **23-4** (52 mg, 0,045 mmol) se disolvió en 5 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 52 mg (100%) del compuesto **23-5**. MS (ESI) *m/z* 497 [M+2H], 993 [M+H].

15 [0472] **Compuesto 23-6:** A una solución del Compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol), el compuesto **23-6** (52 mg, 0,051 mmol) y DIEA (0,030 mL, 0,17 mmol) en 2 mL de DMF se agregaron 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 26 mg (61%) del compuesto **23-6**. MS (ESI) *m/z* 583 [M+4H], 777 [M+3H], 1165 [M+2H].

20 [0473] **Compuesto 23:** El compuesto **23-6** (26 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 10 μ L (0,31 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de clorhidrato IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 10 mg (40%) del Ejemplo 23. MS (ESI) *m/z* 550 [M+4H], 733 [M+3H], 1100 [M+2H].

25

Tabla 3. Estructuras de los compuestos 1-23

30

35

40

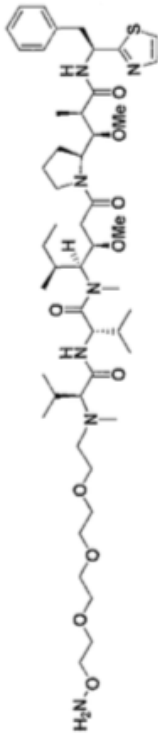
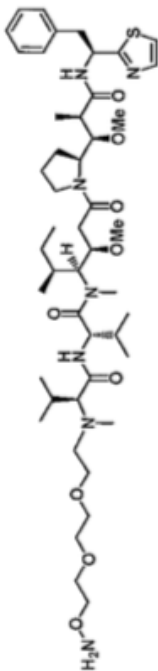
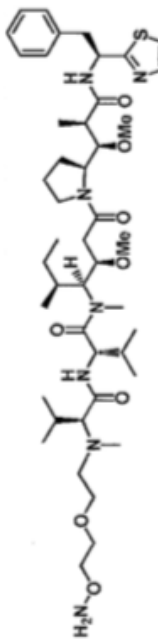
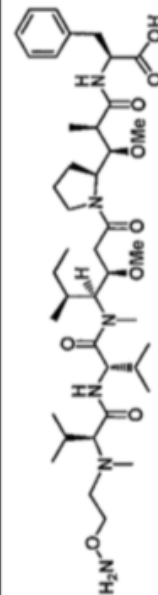
45

50

55

60

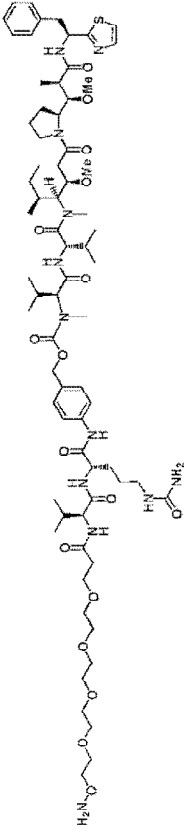
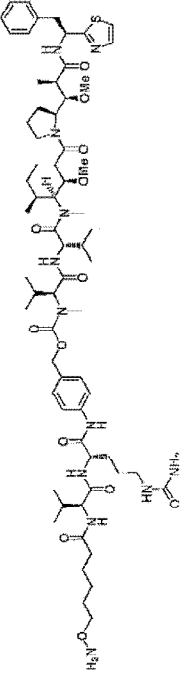
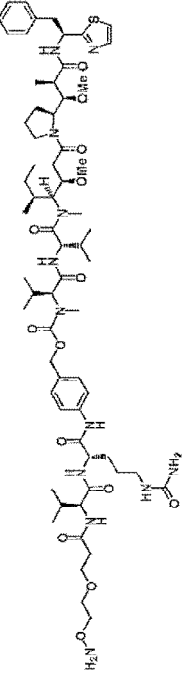
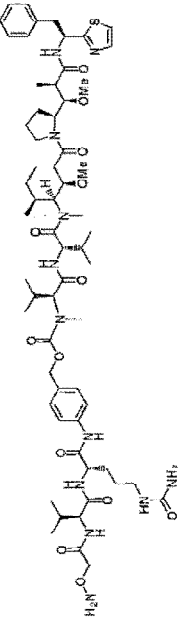
65

Ejemplo	Estructura
1	
2	
3	
4	

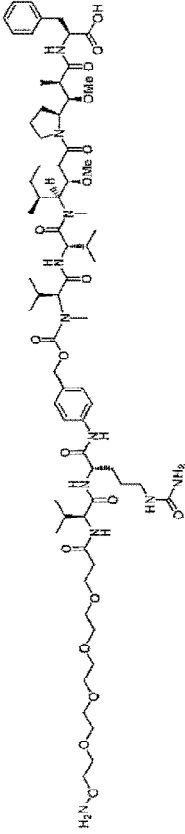
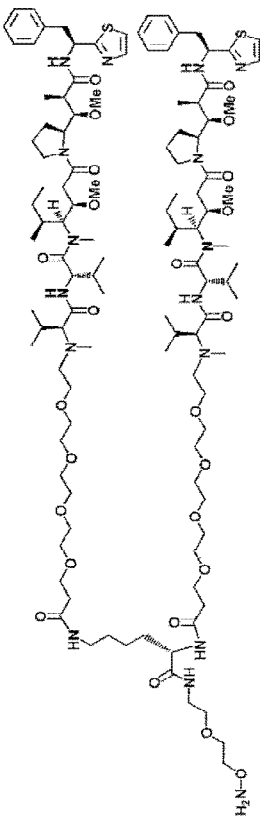
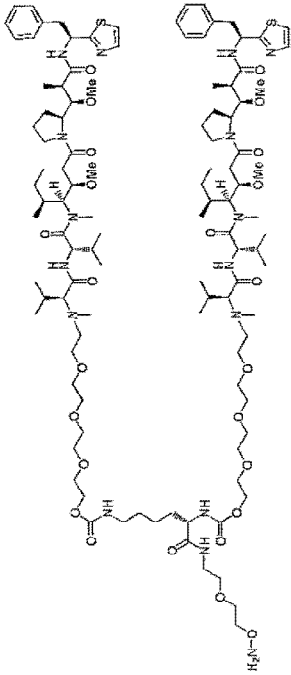
(continúa)

5	
6	
7	
8	
9	

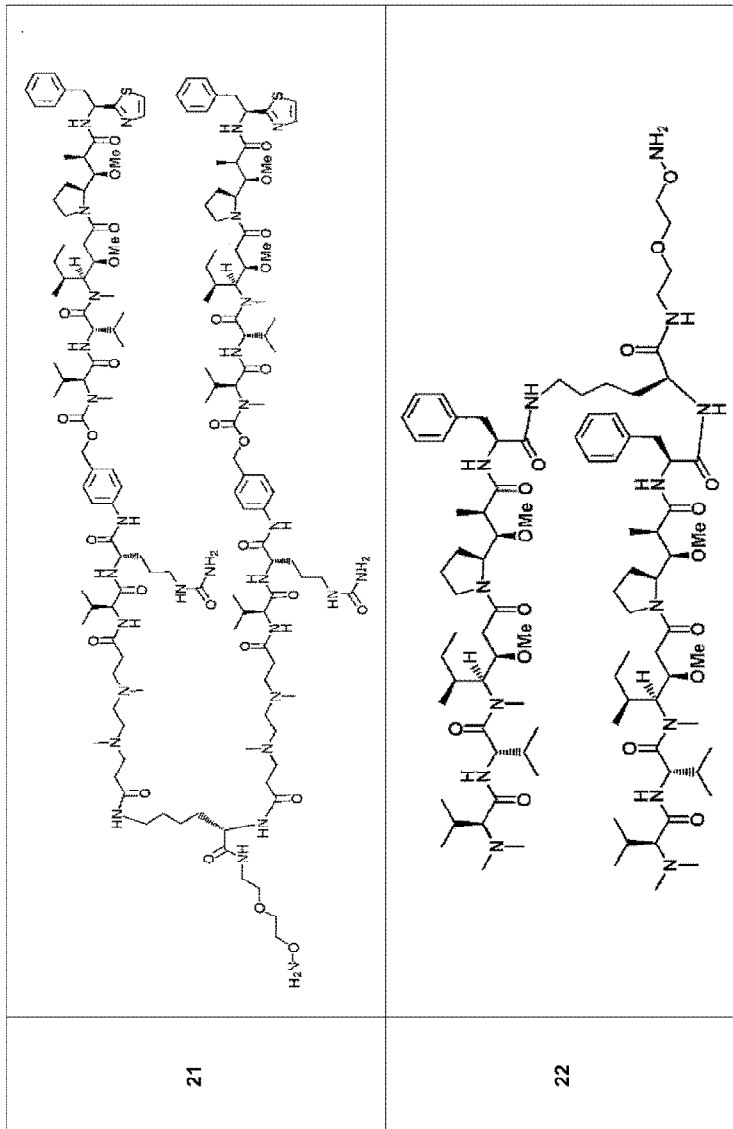
(continúa)

<p>14</p>	 <p>Chemical structure of compound 14: A complex molecule featuring a central amide linkage. On the left, a long chain contains a primary amine group (H₂N) and a polyether segment. On the right, a chain includes a secondary amine, a methyl group, a methoxy group (OMe), and a thiazole ring substituted with a phenyl group.</p>
<p>15</p>	 <p>Chemical structure of compound 15: Similar to 14, but the long chain on the left is replaced by a shorter chain ending in a primary amine group (H₂N).</p>
<p>16</p>	 <p>Chemical structure of compound 16: Similar to 14, but the long chain on the left is replaced by a shorter chain ending in a primary amine group (H₂N).</p>
<p>17</p>	 <p>Chemical structure of compound 17: Similar to 14, but the long chain on the left is replaced by a shorter chain ending in a primary amine group (H₂N).</p>

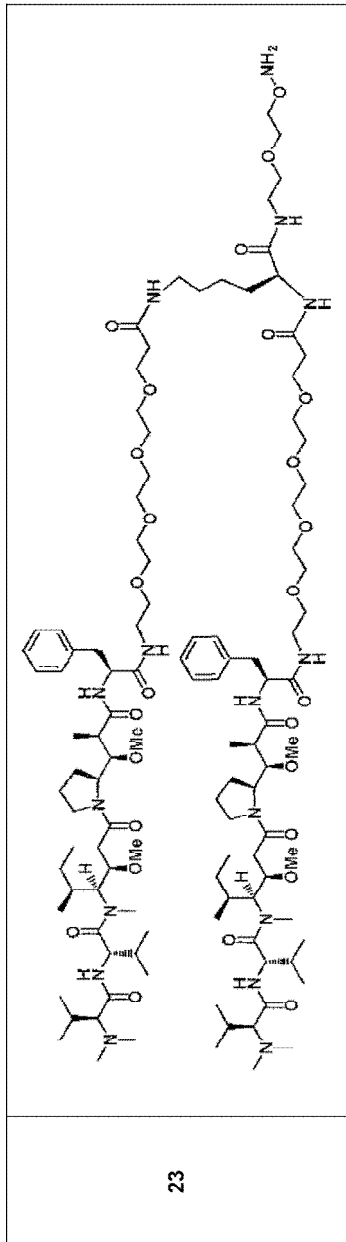
(continúa)

<p>18</p>	
<p>19</p>	
<p>20</p>	

(continúa)



(continúa)



Ejemplo 24: Transfección transitoria

[0474] El cultivo de CHO-S se siembra a $0,75 \times 10^6$ /ml aproximadamente 16 horas antes de la transfección en medio FreeStyle Cho. Las células están listas para transfectar al día siguiente cuando el recuento de células ha alcanzado $1,4 - 1,6 \times 10^6$ /mL. Cuando las células alcanzan el recuento objetivo, se añaden 400 mM de stock de pAF a una concentración de cultivo final de 1,4 mM. El complejo PEI/ADN se prepara como se describe: el ADN ($1,42 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ células) se disuelve en RPMI (5% (v/v) del volumen total del cultivo), la mezcla de ADN/RPMI se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añade la reserva de PEI (1 mg/ml) a la solución de ADN en una proporción de 3:1 (ml de PEI/ μg de ADN) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. El cultivo se añade suavemente a la mezcla y se agita. Los matraces se transfieren a una incubadora a 32°C. En el día 6 posterior a la transfección, se realiza un análisis de transferencia de Western. En el día 7 después de la transfección, se recoge el sobrenadante.

Ejemplo 25: Estudio de eficacia in vivo de PSMA-ADC

[0475] La eficacia antitumoral de ARX- α PSMA conjugada con NCA1 se ensayó en un modelo de ratón LNCaP. Las células de cáncer de próstata LNCaP que expresan niveles altos de PSMA se obtuvieron de ATCC y se expandieron *in vitro* siguiendo las instrucciones de ATCC. Se desarrollaron xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP en ratones macho desnudos. Los ratones desnudos se implantaron por vía subcutánea. Los ratones se pesaron y se midieron para determinar el tumor en tres dimensiones usando un calibrador electrónico. El volumen del tumor individual se calculó como altura X ancho X longitud. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por la aparición de los tumores) de tamaños apropiados se asignaron al azar a grupos de tratamiento y se dosificaron por peso corporal individual en el Día 33 (tres (3) semanas después de la inyección con células). Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 1 y 2.

Tabla 4: Grupos de prueba para el estudio de eficacia in vivo de PSMA

Grupo	Tratamiento	Dosis	Concentración	Volumen de dosis	Ruta	Calendario
1	Vehículo	N/A	N/A	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
2	ARX \langle PSMA(A116)-NCA1	1 mg/kg	0,2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
3	ARX \langle PSMA(A116)-NCA1	3 mg/kg	0,6 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
4	ARX \langle PSMA(A116)-NCA1	10 mg/kg	2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
5	ARX- \langle PSMA (A116)	10 mg/kg	2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1

*Diez (10) ratones desnudos por grupo

Ejemplo 26: Estudio de eficacia in vivo de PSMA-ADC (alquilador de ADN)

[0476] La eficacia antitumoral de ARX- α PSMA conjugada con ARX-duocarmicina se ensaya en un modelo de ratón LNCaP. Las células de cáncer de próstata LNCaP que expresan altos niveles de PSMA se obtienen de ATCC y se expanden *in vitro* siguiendo las instrucciones de ATCC. Los xenoinjertos de carcinoma de próstata humano LNCaP se cultivan en ratones macho desnudos. Los ratones desnudos se implantan por vía subcutánea. Los ratones se pesan y se miden para el tumor en tres dimensiones usando un calibrador electrónico. El volumen del tumor individual se calcula como altura X ancho X longitud. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por la aparición de los tumores) de tamaños apropiados se asignan al azar a grupos de tratamiento y se dosifican por peso corporal individual en el Día 33 (tres (3) semanas después de la inyección con células).

Tabla 5: Grupos de prueba para el estudio de eficacia in vivo de PSMA

Grupo	Tratamiento	Dosis	Concentración	Volumen de dosis	Ruta	Calendario
1	Vehicle	N/A	N/A	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
2	ARX \langle PSMA-ARX-duocarmicina	1 mg/kg	0,2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
3	ARX \langle PSMA-ARX-duocarmicina	3 mg/kg	0,6 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
4	ARX \langle PSMA-ARX-duocarmicina	10 mg/kg	2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
5	ARX- \langle PSMA (A116)	10 mg/kg	2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1

*Diez (10) ratones desnudos por grupo

Ejemplo 27: Estudio de viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata ARX α PSMA (A116)-NCA1 72h

[0477] La eficacia antitumoral de ARX- α -PSMA conjugada con el inhibidor de tubulina NCA1, un derivado de dolastatina patentado por ARX y dolastatina no enlazada, "libre" se ensayó en líneas celulares de cáncer de próstata

LNCaP y MDA-PCa-2b. Las dos líneas celulares de cáncer de próstata y las células PC-3, utilizadas como control negativo, se cultivaron y luego se trataron con dolastatina no conjugada, duocarmicina no conjugada o ADC ARX- α PSMA-duocarmicina y 72 horas después del tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando el kit-8 de recuento de célula Dojindo (basado en WST-8). Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 3A, 3B y 4.

Ejemplo 28: Estudio de viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata con PSMA-duocarmicina 72h

[0478] La eficacia antitumoral de ARX- α -PSMA conjugada con la alquilactina de ADN duocarmicina se ensayó en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y MDA-PCa-2b. Las dos líneas celulares de cáncer de próstata y las células PC-3, utilizadas como control negativo, se cultivaron y luego se trataron con dolastatina no conjugada, duocarmicina no conjugada o ADC ARX- α PSMA-duo-carmicina y 72 horas después del tratamiento se midió la viabilidad celular utilizando el kit de recuento de células Dojindo-8 (basado en WST-8). Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 5A, 5B y 6.

Ejemplo 29: Ensayo clínico en humanos de ARX α PSMA (A116)-NCA1

[0479] Ensayo clínico en humanos de la seguridad y/o eficacia de ARX α PSMA (A116)-NCA1 para el tratamiento del cáncer de próstata.

[0480] Objetivo: Comparar la seguridad y la farmacocinética de la composición administrada que comprende el derivado de dolastatina unido a ARX- α PSMA.

[0481] Diseño del estudio: Este estudio será un estudio de Fase I, de centro único, abierto, aleatorizado de dosis, seguido de un estudio de Fase II en pacientes con cáncer de próstata. Los pacientes no deben haber tenido una exposición al derivado de dolastatina unido a α PSMA antes de la entrada en el estudio. Los pacientes no deben haber recibido tratamiento para el cáncer dentro de las 2 semanas posteriores al inicio del ensayo. Los tratamientos incluyen el uso de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyéticos y terapia biológica como los anticuerpos monoclonales. Los pacientes deben haberse recuperado de todas las toxicidades (de grado 0 o 1) asociadas con el tratamiento previo. Se evaluó la seguridad de todos los sujetos y se recolectaron todas las colecciones de sangre para el análisis farmacocinético según lo programado. Todos los estudios se realizan con la aprobación del comité de ética institucional y el consentimiento del paciente.

[0482] Fase I: Los pacientes reciben i.v. ARX α PSMA(A116)-NCA1 en los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Las dosis de ARX α PSMA(A116)-NCA1 se pueden mantener o modificar por toxicidad según las evaluaciones que se detallan a continuación. El tratamiento se repite cada 28 días en ausencia de toxicidad inaceptable. Las cohortes de 3-6 pacientes reciben dosis crecientes de ARX α PSMA(A116)-NCA1 hasta que se determina la dosis máxima tolerada (MTD) para ARX α PSMA(A116)-NCA1. La MTD se define como la dosis que precede a la que 2 de 3 o 2 de 6 pacientes experimentan toxicidad limitante de la dosis. Las toxicidades limitantes de la dosis se determinan de acuerdo con las definiciones y estándares establecidos por la terminología común para eventos adversos (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), versión 3,0 (9 de agosto de 2006).

[0483] Fase II: Los pacientes reciben ARX α PSMA(A116)-NCA1 como en la fase I en el MTD determinado en la fase I. El tratamiento se repite cada 4 semanas para 2-6 cursos en la ausencia de progresión de enfermedad o toxicidad inaceptable. Después de completar 2 cursos de terapia de estudio, los pacientes que logran una respuesta completa o parcial pueden recibir 4 cursos adicionales. Los pacientes que mantienen la enfermedad estable durante más de 2 meses después de completar 6 cursos de terapia de estudio pueden recibir 6 cursos adicionales al momento de la progresión de la enfermedad, siempre que cumplan con los criterios de elegibilidad originales.

[0484] El muestreo de sangre: la sangre de serie se extrae por punción de la vena directa antes y después de la administración de ARX α PSMA(A116)-NCA1. Las muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones séricas se obtienen aproximadamente 10 minutos antes de la dosificación y aproximadamente en los siguientes momentos después de la dosificación: días 1, 8 y 15. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

[0485] Farmacocinética: Los pacientes se someten a la recogida de muestras de plasma/suero para la evaluación farmacocinética antes de comenzar el tratamiento y en los días 1, 8 y 15. Los parámetros farmacocinéticos se calculan por métodos independientes modelo en un sistema de ordenador Digital Equipment Corporation VAX 8600 usando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración sérica máxima (C_{max}); tiempo hasta la concentración máxima en suero (t_{max}); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo de sangre (AUC_{0-72}) calculado con el uso de la regla trapezoidal lineal; y vida media de eliminación terminal ($T_{1/2}$), calculada a partir de la constante de velocidad de eliminación. La constante de velocidad de eliminación se estima mediante regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la gráfica de concentración-tiempo log-lineal. La media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (C_v) de los parámetros farmacocinéticos se calculan para cada tratamiento. Se calcula la relación de las medias de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

[0486] Respuesta del paciente a la terapia de combinación: la respuesta del paciente es evaluada a través de la formación de imágenes con rayos X, tomografía computarizada y la resonancia magnética, y la imagen se lleva a cabo antes de comenzar el estudio y al final del primer ciclo, con imágenes adicionales realizadas cada cuatro semanas o al final de los ciclos posteriores. Las modalidades de imagen se eligen en función del tipo de cáncer y la viabilidad/disponibilidad, y la misma modalidad de imagen se utiliza para tipos de cáncer similares, así como a lo largo del curso de estudio de cada paciente. Las tasas de respuesta se determinan utilizando los criterios RECIST. (Therasse y otros, J. Natl. Cancer Inst. 2000, 2 de febrero; 92 (3): 205-16; <http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). Los pacientes también se someten a biopsia de cáncer/tumor para evaluar los cambios en el fenotipo de las células de cáncer progenitoras y el crecimiento clonogénico por citometría de flujo, transferencia de Western e IHC, y por cambios en la citogenética por FISH. Después de completar el tratamiento del estudio, los pacientes son monitorizados periódicamente durante 4 semanas.

Ejemplo 30: Tratamiento para el cáncer de próstata

[0487] Ensayo clínico en humanos de la seguridad y la eficacia de ARX α PSMA(A116)-NCA1 para el tratamiento del cáncer de próstata

[0488] Objetivo: Comparar la eficacia y la toxicidad de ARX α PSMA(A116)-NCA1 solo seguido en la progresión de la enfermedad mediante la combinación de trastuzumab y paclitaxel frente a la combinación de primera línea de trastuzumab y paclitaxel en mujeres con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2.

[0489] Diseño del estudio: Este estudio es un estudio aleatorizado, multicéntrico. Los pacientes se estratifican según el grado de sobreexpresión de HER2/neu (2+ vs 3+), tratamiento adyuvante previo que contiene antraciclina (no hay tratamiento previo versus tratamiento previo sin radioterapia en la pared torácica izquierda versus tratamiento previo con radioterapia en la pared torácica izquierda), estado del receptor de estrógeno (positivo frente a negativo frente a desconocido), terapia previa (primera línea frente a segunda/tercera línea) y centro. Los pacientes se asignan al azar a uno de los dos brazos de tratamiento. Brazo I: los pacientes reciben el derivado de dolastatin IV ligado a trastuzumab durante 30-90 minutos por semana. En el momento de la progresión de la enfermedad, los pacientes reciben la combinación de derivado de dolastatina unido a trastuzumab IV y paclitaxel IV como en el brazo II. Brazo II: los pacientes reciben el derivado de dolastatina ligado a trastuzumab IV durante 30-90 minutos por semana. Paclitaxel se administra por vía intravenosa durante 1 hora semanalmente durante 3 semanas, seguido de 1 semana de descanso.

[0490] El tratamiento continúa en ambos brazos en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. La calidad de vida se evalúa al inicio del estudio y el día 1 de los cursos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 12. Se realiza un seguimiento de los pacientes a los 1, 3 y 6 meses y luego cada 6 meses a partir de entonces.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0491]

<110 >Ambrx, Inc. Barnett, Richard S. Tian, Feng Hays Putnam, Anna-Maria A. Gymnopoulos, Marco Knudsen, Nickolas A. Beck, Andrew Sun, Ying

<120 > Conjugados farmacéuticos de anticuerpo de antígeno de membrana de próstata específica

<130 > AMBX-0178.00PCT

<150 > 61/656.883

<151 > 2012-06-07

<160 > 14

<170 > PatentIn version 3,5

<210 > 1

<211 > 214

<212 > PRT

<213 > Homo sapiens

<400 > 1

ES 2 725 329 T3

5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

10 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

15 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

25 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

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

35 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

40 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

45 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

50
55
60
65

<210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 725 329 T3

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

 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

 10 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 15

 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 20 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 25

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

 30 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

 35

 40

 45

 50

 55

 60

 65

ES 2 725 329 T3

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

ES 2 725 329 T3

<210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X es aminoácido no natural
 10
 <400> 3

 Asp Ile Val Met Thr Gln Xaa His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 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> 4
 <211> 214

ES 2 725 329 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X es aminoácido no natural

<400> 4

5

10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

15

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

20

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

25

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

30

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

35

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

40

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

45

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

50

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

55

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

60

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

65

<210> 5
 <211> 214

ES 2 725 329 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> X es aminoácido no natural

<400> 5

10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

15

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

20

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

25

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

30

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

60

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65

<220>
<221> MISC_FEATURE

ES 2 725 329 T3

<222> (109)..(109)

<223> X es aminoácido no natural

<400> 6

5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

10

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

15

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

20

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

25

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

30

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Xaa Val Ala Ala
100 105 110

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 214

60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

65

<222> (155)..(155)

ES 2 725 329 T3

<223> X es aminoácido no natural

<400> 7

5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

15 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

20 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

35 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

65 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> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (202)..(202)

<223> X es aminoácido no natural

ES 2 725 329 T3

<400> 8

5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

10 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

15 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

35 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

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

45 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 Xaa Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

50 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

55 <210> 9
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (116)..(116)
<223> X es aminoácido no natural

65 <400> 9

ES 2 725 329 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Xaa Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

ES 2 725 329 T3

5 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

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

10 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

15 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

20 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

25 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

30 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

40 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

45 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 10
 <211> 444
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (280)..(280)
 55 <223> X es aminoácido no natural

<400> 10

60

65

ES 2 725 329 T3

1 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 5 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 10 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 15 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 20 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 25 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 35 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 40 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 45 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 50 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 55 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 60 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 65 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 70 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 75 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255

ES 2 725 329 T3

5 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

5 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Xaa Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

10 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

15 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

20 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

30 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

35 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

45 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

50 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

55 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 11
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (294)..(294)
<223> X es aminoácido no natural

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr

ES 2 725 329 T3

5 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

10 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

15 Pro Arg Glu Glu Gln Xaa Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

20 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

25 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

35 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

40 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

50 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

55 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

60 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

65 <210> 12
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (340)..(340)
<223> X es aminoácido no natural

<400> 12

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

ES 2 725 329 T3

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 5
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 15
 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 30
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 115 120 125
 35
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 40
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 45
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 50
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 55
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 60
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 65
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

ES 2 725 329 T3

5 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 15 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 30 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 115 120 125
 35 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 40 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 45 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 50 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 55 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 60 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

65

ES 2 725 329 T3

5 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 10 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 15 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 20 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Xaa Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 25 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 30 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 35 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440
 40 <210> 14
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (417)..(417)
 <223> X es aminoácido no natural
 50 <400> 14
 55 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 60
 65

ES 2 725 329 T3

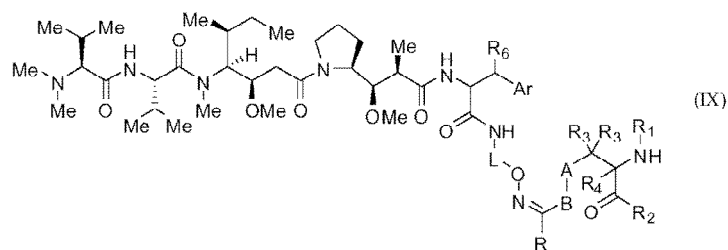
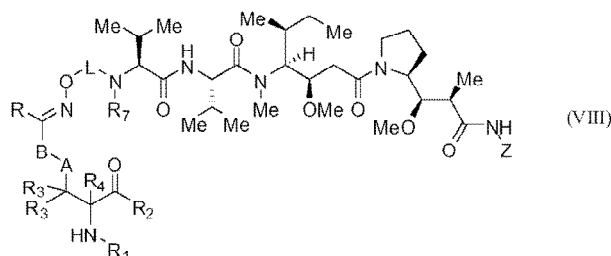
5 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 15 Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 25 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 30 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 35 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 40 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 45 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 50 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 55 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 60 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 65

ES 2 725 329 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 5
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 10
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 15
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 20
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 25
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 30
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 35
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 40
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 45
 Xaa Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 50
 55
 60
 65
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la Fórmula (VIII) o (IX), en donde el compuesto es un anticuerpo antigénico prostático específico de membrana (αPSMA) conjugado a una dolastatina, en donde la conjugación ocurre a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde las fórmulas (VIII) y (IX) corresponden a:



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno, arileno 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 sustituidos) alquileno-, -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;

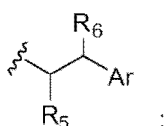
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9;

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

Z tiene la estructura de:



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

R₈ es OH;

R₆ es OH o H;

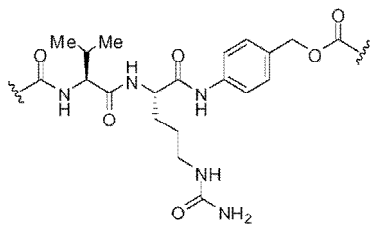
Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en-alquileno-, -alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-C(O)-, -(alquileno-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_{n'''}-NHC(O)-(alquileno-O)_{n''}-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-W-, -alquileno-C(O)-W-, -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-C(O)-, y -(alquileno-O)_n-alquileno-U-alquileno-;

5

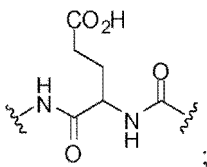
W tiene la estructura de:



10

15

U tiene la estructura de:



20

25

y
 cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;
 en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;
 en donde alquileno inferior significa un grupo alquileno con ocho o menos átomos de carbono; o solvato de los mismos.

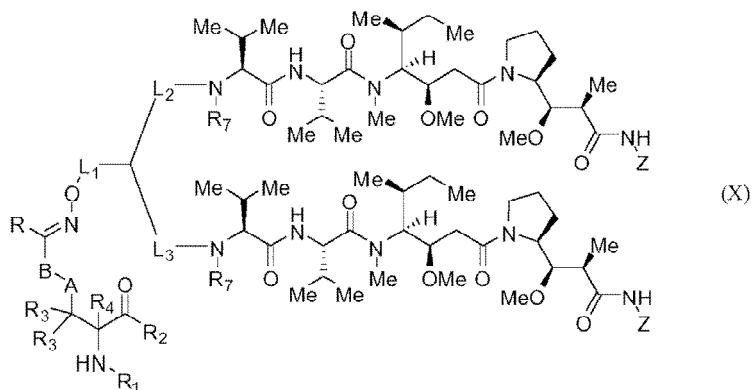
30

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo αPSMA comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural.

35

3. El compuesto, o sal del mismo, que comprende la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), en donde el compuesto es un anticuerpo antígeno prostático específico de membrana (αPSMA) conjugado a una dolastatina, en donde ocurre la conjugación a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) corresponden a:

40



45

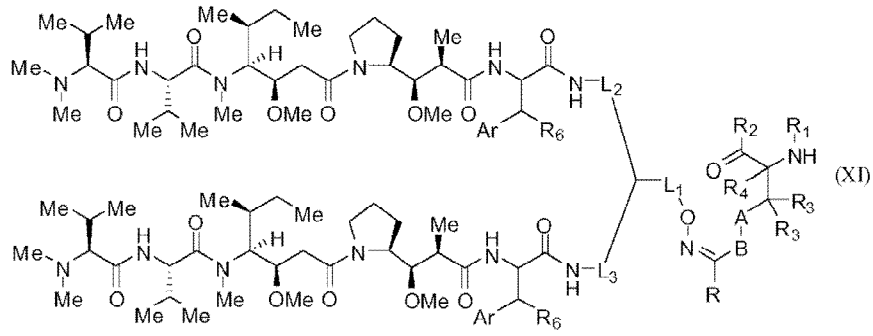
50

55

60

65

5



10

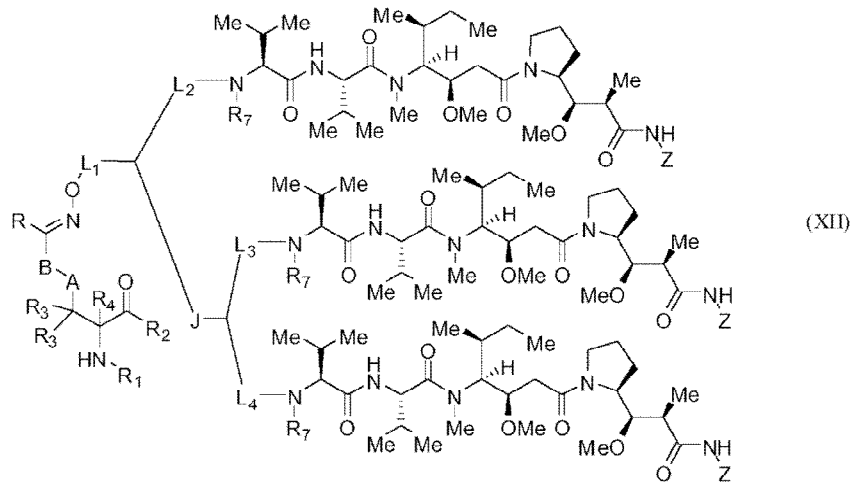
15

20

25

30

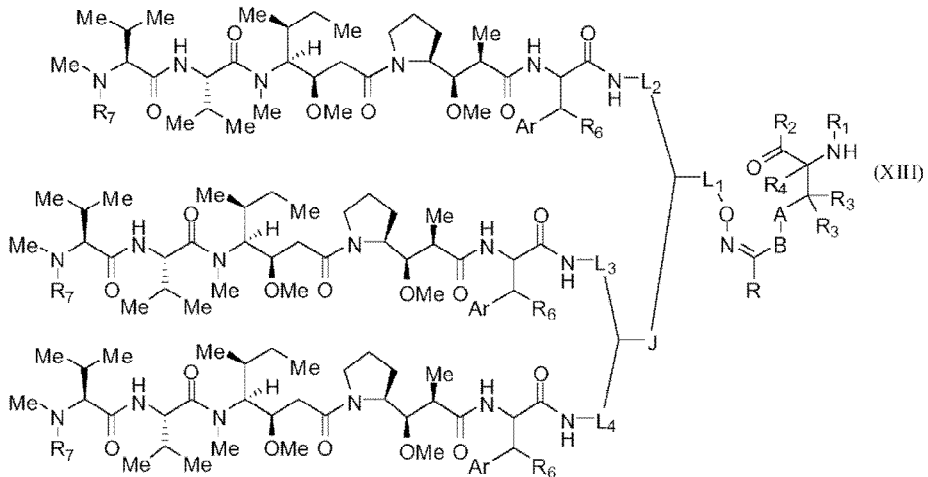
35



40

45

50



55

en donde:

60

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

65

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heterocalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o sustituidos) alquileno-, -S-, -S-(alquileno o alquileno

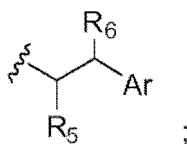
sustituido)-, $-S(O)_k$ - donde k es 1, 2 o 3, $-S(O)_k$ (alquileno o alquileno sustituido)-, $-C(O)-$, $-C(O)$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-C(S)-$, $-C(S)$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-N(R')$ -, $-NR'$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-C(O)N(R')$ -, $-CON(R')$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-CSN(R')$ -, $-CSN(R')$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-N(R')CO$ - (alquileno o alquileno sustituido)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')$ -, $-N(R')C(O)N(R')$ -, $-N(R')C(S)N(R')$ -, $-N(R')S(O)_kN(R')$ -, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')$ -, $-C(R')=N=N=$, $-C(R')_2N=N-$, y $-C(R')_2N(R')-N(R')$ -, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

R_1 y/o R_2 es un anticuerpo α PSMA;

en donde el anticuerpo α PSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; R_3 y R_4 son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R_3 y R_4 o dos grupos R_3 forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:



R_5 es H, CO_2H , C_1-C_6 alquilo, o tiazol;

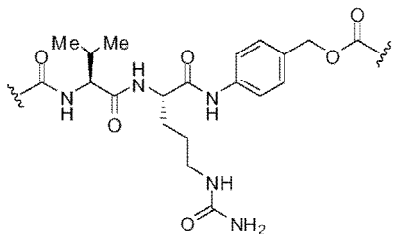
R_6 es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

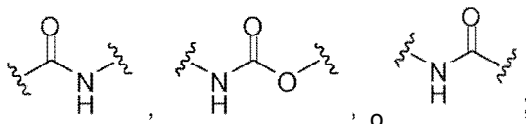
R_7 es alquilo C_1-C_6 o hidrógeno;

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son, cada uno, enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileno, $-(alquileno-O)_n$ -alquileno-J-, alquileno'-J-(alquileno)-, $-(O)_n$ -alquileno-, $-J$ -(alquileno-O) $_n$ -alquileno-, $-(alquileno-O)_n$ -alquileno-J-(alquileno-O) $_n$ -alquileno'-J'-, $-(alquileno-O)_n$ -alquileno-J-alquileno'-, -W-, -alquileno-W-, alquileno'-J-(alquileno-NMe) $_n$ -alquileno-W-, -J-(alquileno-NMe) $_n$ -alquileno-W-, -J-alquileno-NMe-alquileno'-NMe-alquileno''-W-, y alquileno-J-alquileno'-NMe-alquileno''-NMe-alquileno'''-W-;

W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:



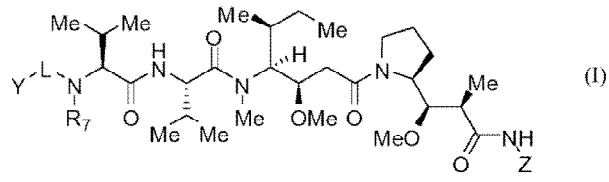
y

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

en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono; en donde alquileno inferior significa un grupo alquileno con ocho o menos átomos de carbono.

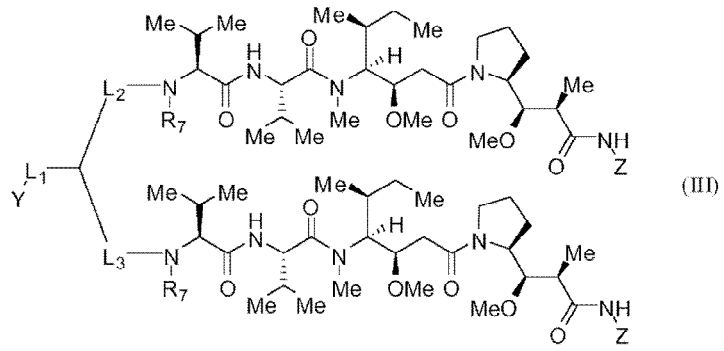
4. Un método para derivatizar un análogo de dolastatina que comprende las fórmulas (I), (III), (IV), (V) o (VI), en donde el análogo de dolastatina derivatizado es un anticuerpo α PSMA conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación ocurre a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, el método que comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de Fórmula (XXXVII), en donde la Fórmula (I), (III), (IV), (V) o (VI) corresponden a las:

5



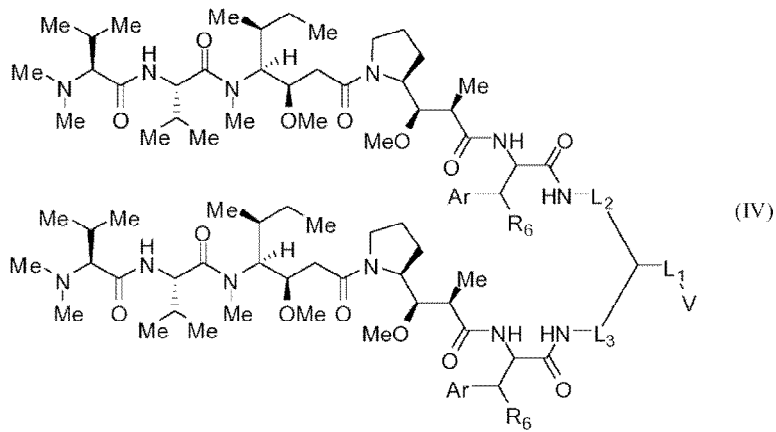
;

10



;

25



;

40

45

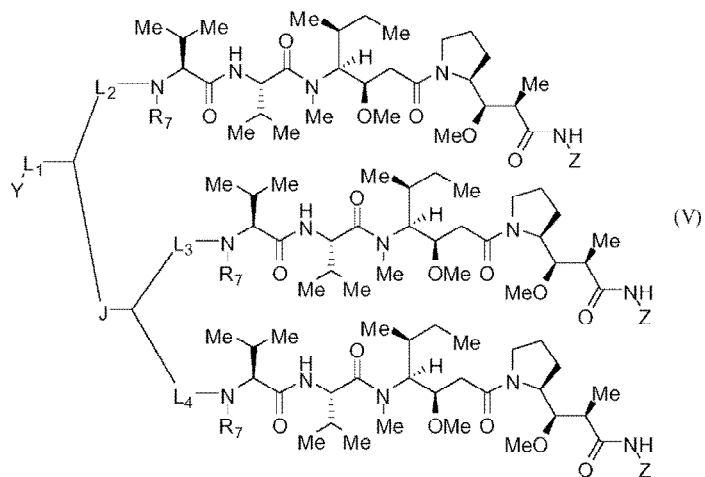
50

55

60

65

5



10

15

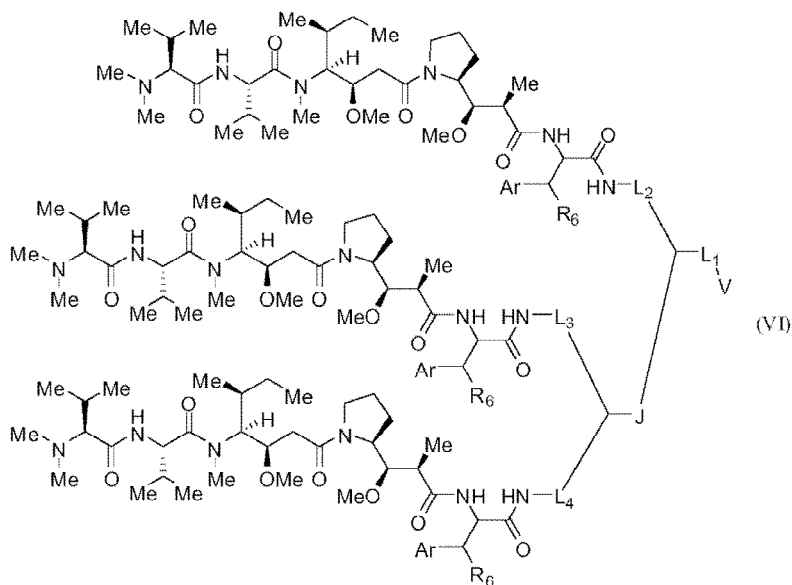
20

25

30

35

40

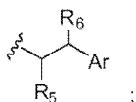


en donde:

45

Z tiene la estructura de:

50



55

R₅ es H, COR, C₁-C₆ alquilo, o tiazol;
 R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

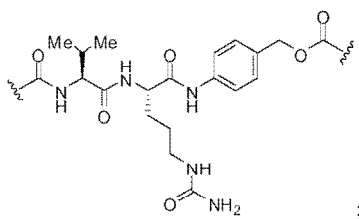
60

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y es NH₂-O- y V es NH₂-O-;
 L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquileo,
 alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n- alquileo, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-
 (CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-
 -, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-
 (alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n'-alquileo-J'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-
 (alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, y J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -
 (alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo"-W-, y -alquileo-J-alquileo'-
 NMe- alquileo"-NMe-alquileo"-W-;

65

W tiene la estructura de:

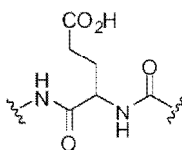
5



10

U tiene la estructura de:

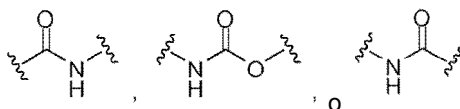
15



20

cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

25

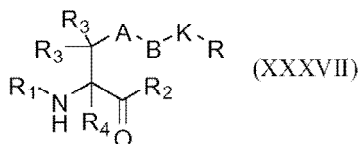


30

o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈, y R₈ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂; y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;

en donde Formula (XXXVII) corresponde a:

35



40

en donde:

45

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

50

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, -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;

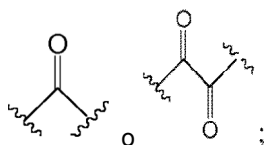
55

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

60

K es

65



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

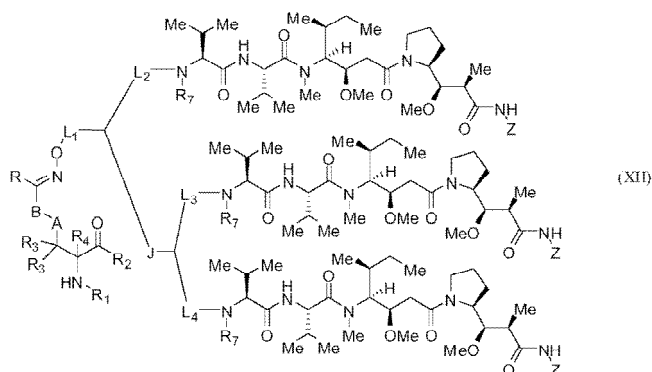
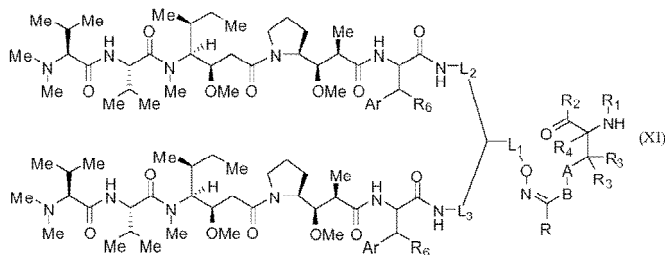
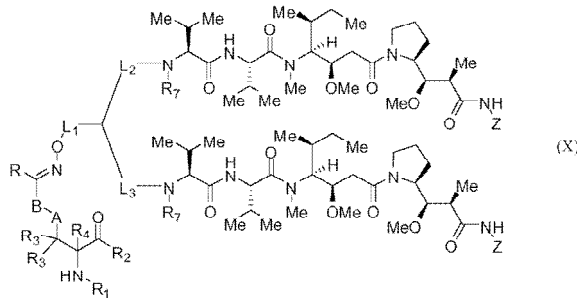
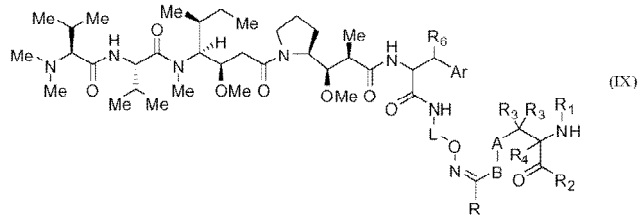
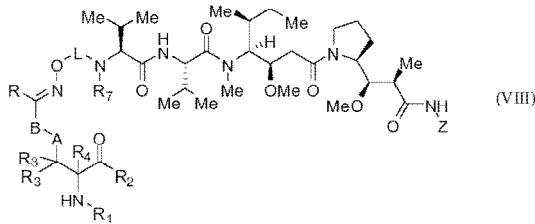
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αPSMA;

en donde el anticuerpo αPSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 9; y

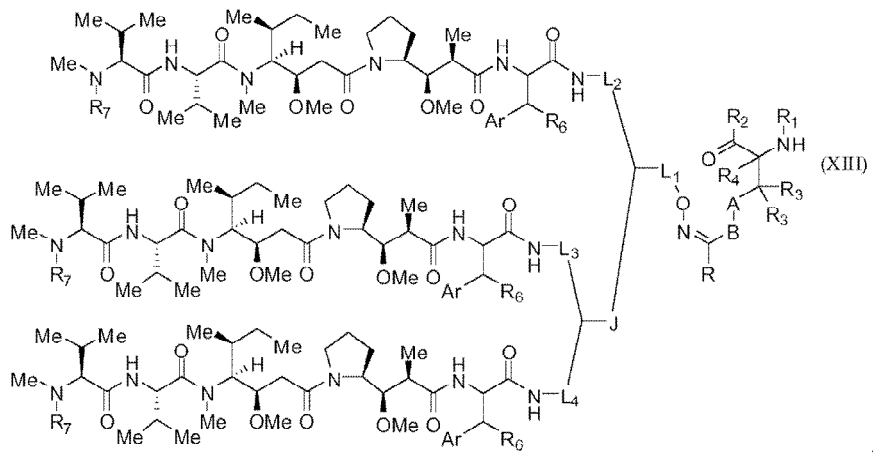
R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior, o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ grupos forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono; en donde alquilenos inferior significa un grupo alquilenos con ocho o menos átomos de carbono.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el análogo de dolastatina derivado comprende al menos un aminoácido que contiene oxima que tiene la estructura de Fórmula (VIII), (IX), (X), (XI), (XII) o (XIII):



5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



6. Método según la reivindicación 5, en el que el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de fórmula (XXXVII) en solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas.

7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el método de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el anticuerpo α PSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO. 9 y una cadena ligera de anticuerpo α PSMA.

8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7, o el método de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el anticuerpo α PSMA comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO. 9, y una cadena ligera de SEQ ID. NO. 1

FIGURA 1

LNCaP (dosificado día 33)

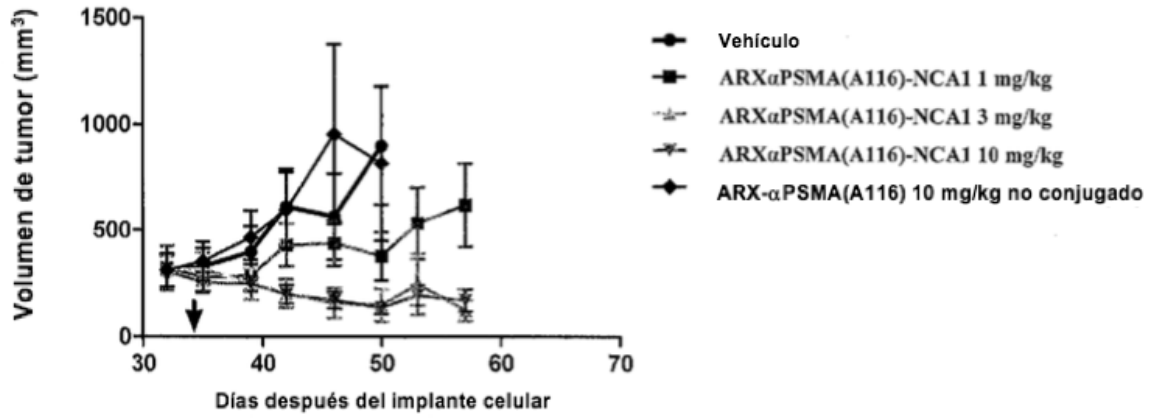


FIGURA 2

Peso corporal LNCaP

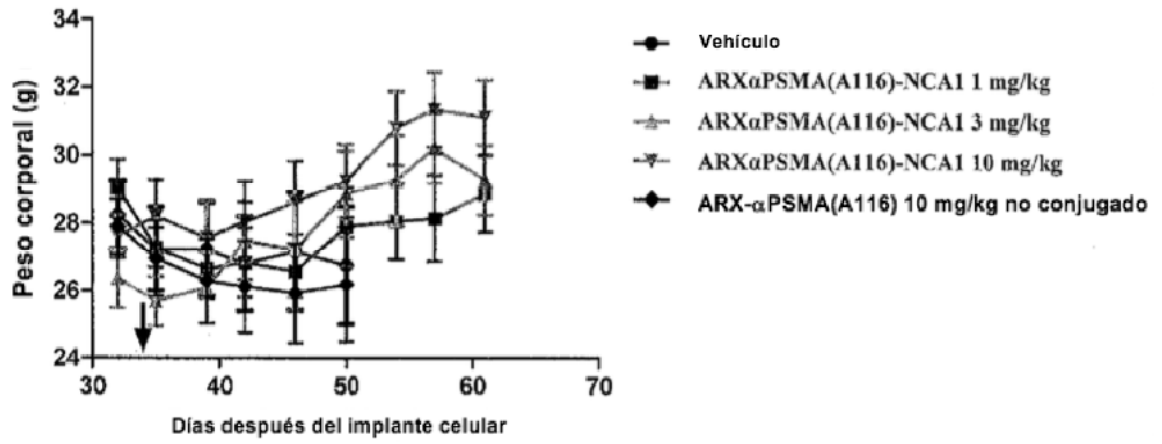
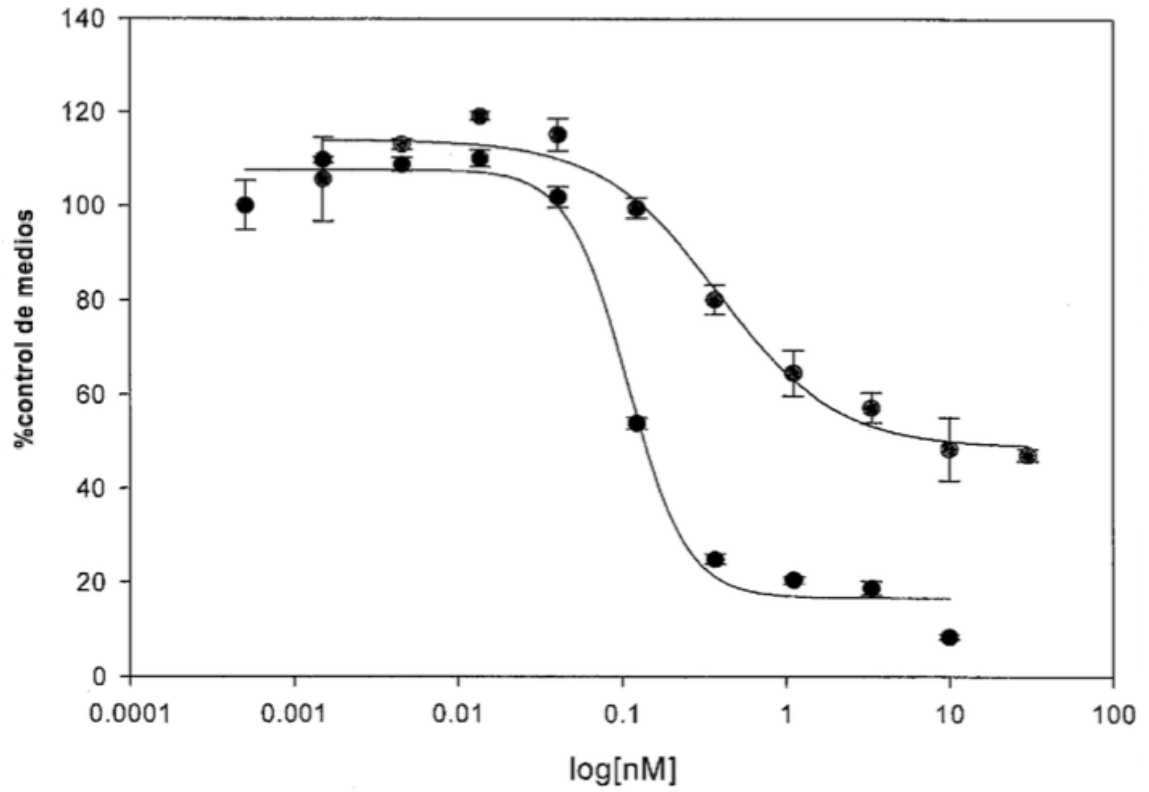


FIGURA 3A

LNCaP, Inhibidor PSMA J591VK-Tubulina



- Fármaco libre de dolastatina CI 50=0.1nM
- antiPSMA-ADC CI 50=0.4nM

FIGURA 3B

MDA-PCa-2, Inhibidor PSMA J591VK-Tubulina

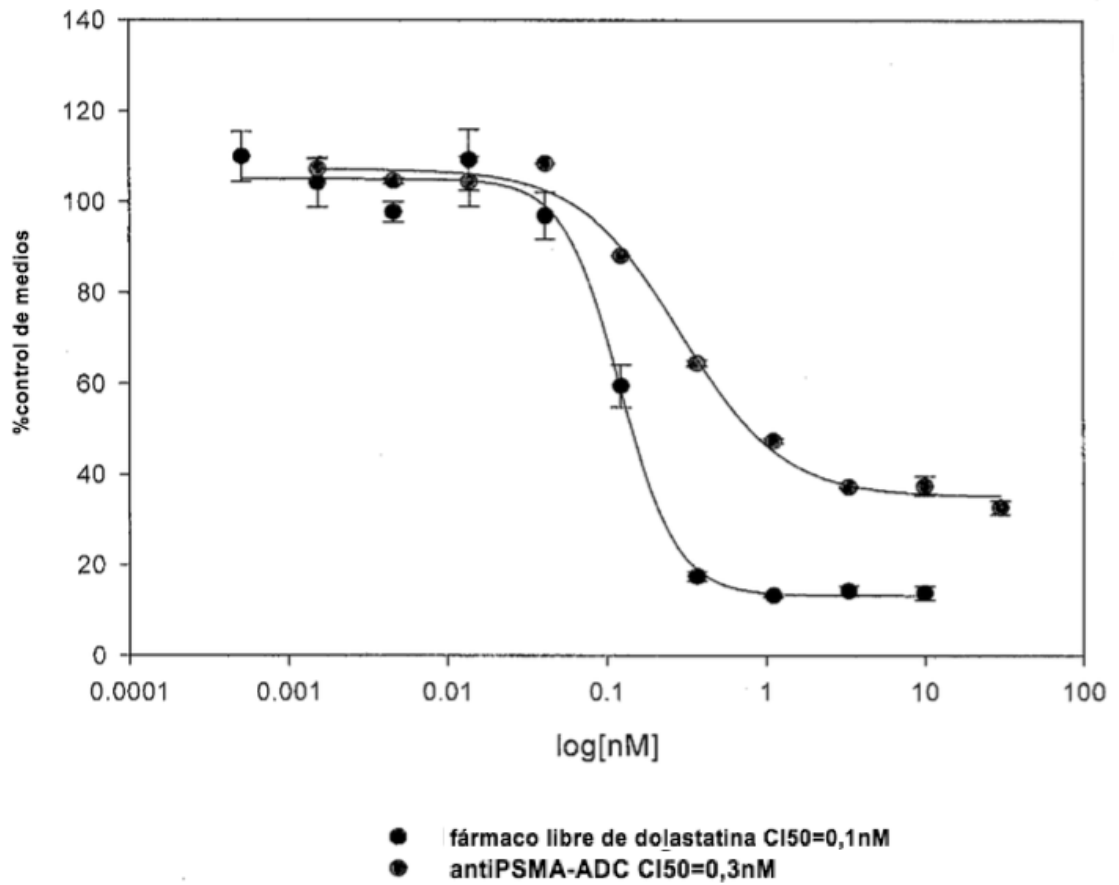


FIGURA 4

PC-3, Ensayo de viabilidad, antiPSMA-NCA1

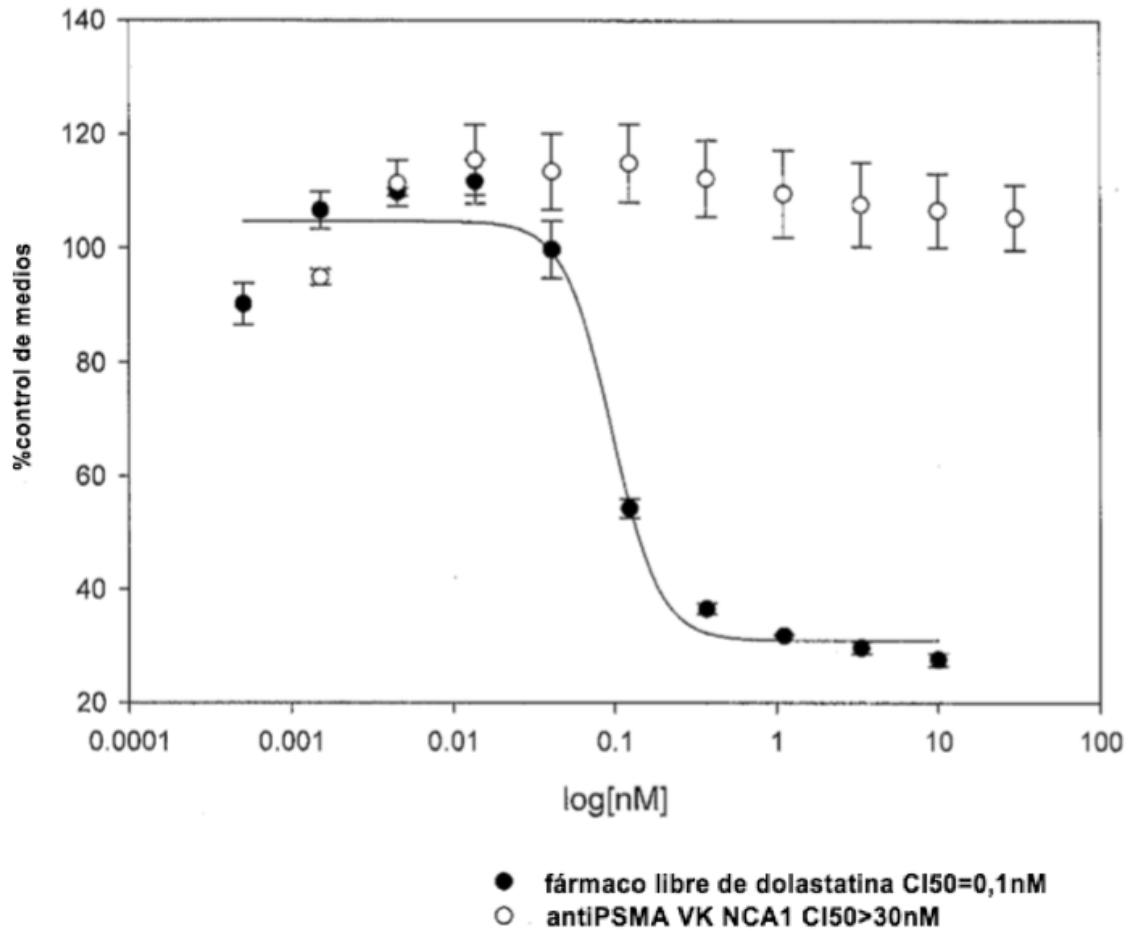


FIGURA 5A

LNCaP, alquilador PSMAJ591VK-ADN

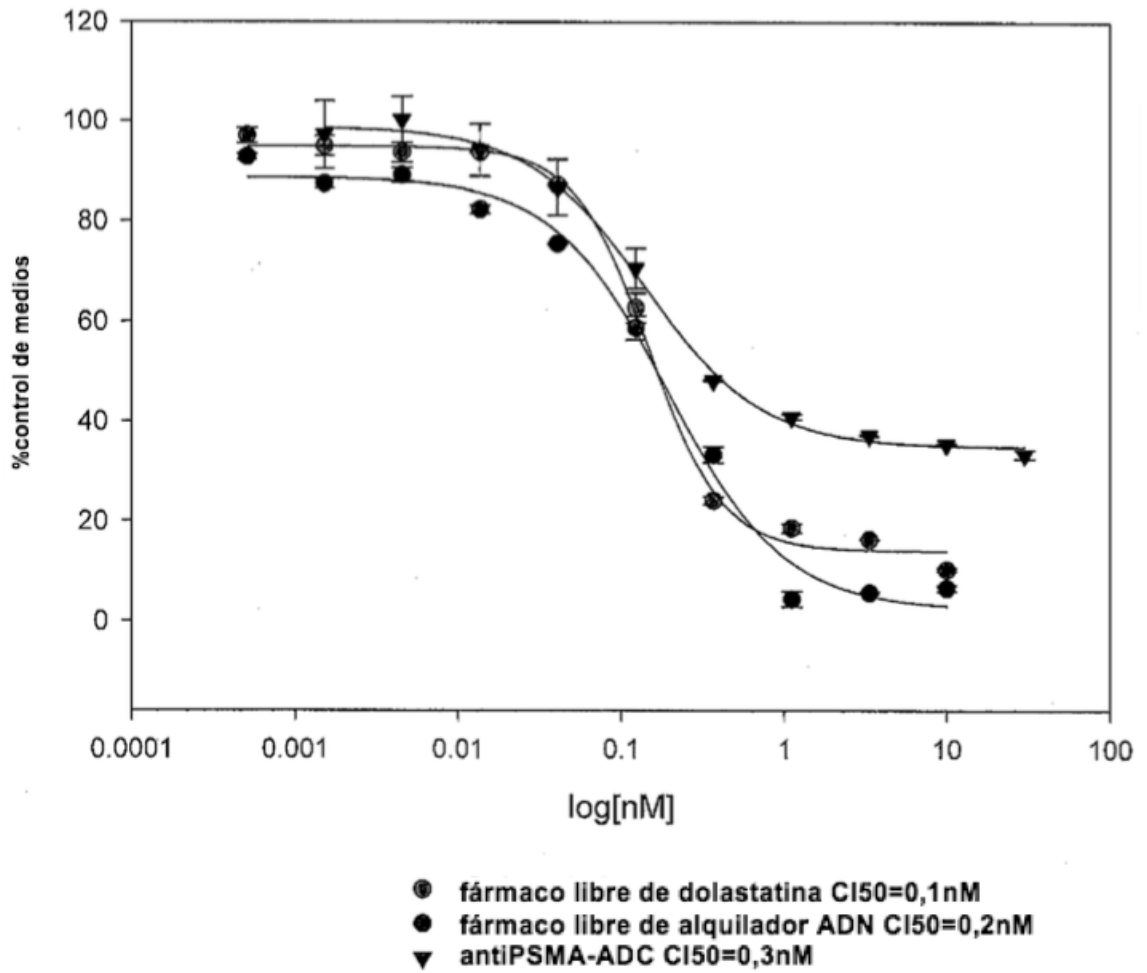
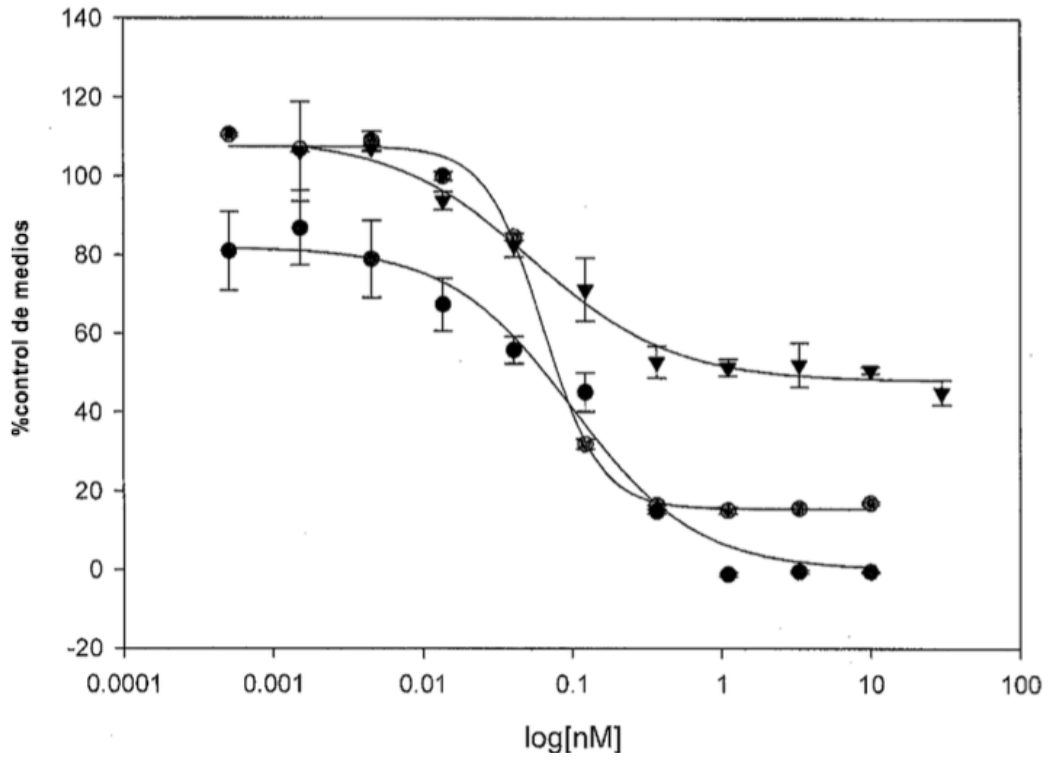


FIGURA 5B

MDA-PCa-2b, alquilador PSMAJ591VK-ADN



- Fármaco libre de dolastatina CI50=0.1nM
- Fármaco libre de alquilantes de ADN CI 50=0.1nM
- ▼ antiPSMA-ADC CI 50=0.2nM

FIGURA 6

PC3, antiPSMAJ591VK-Duo328

