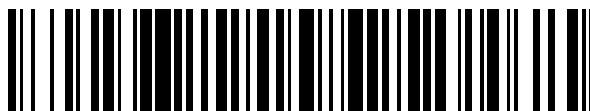


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 864**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

**C07C 247/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/US2013/057677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14036492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13762659 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2890402**

54 Título: **Aminoácidos modificados que comprenden un grupo azido**

30 Prioridad:

**31.08.2012 US 201261696087 P**

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

**29.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STAFFORD, RYAN;  
THANOS, CHRISTOPHER D. y  
YANG, WENJIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 728 864 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

Aminoácidos modificados que comprenden un grupo azido

5 **Campo**

En el presente documento se proporcionan aminoácidos modificados que comprenden un grupo azido, polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los aminoácidos modificados, y métodos para producir los polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los aminoácidos modificados. Los polipéptidos, anticuerpos y conjugados son útiles en los métodos de tratamiento y prevención, métodos de detección y métodos de diagnóstico.

**Antecedentes**

Los polipéptidos obtenidos por ingeniería genética se utilizan ampliamente en aplicaciones de terapia y diagnóstico. Los anticuerpos terapéuticos han sido útiles durante muchos años en, por ejemplo, el tratamiento del cáncer y afecciones inflamatorias. También se utilizan polipéptidos terapéuticos para tratar y prevenir afecciones de la sangre e infecciones víricas. Se han utilizado polipéptidos de diagnóstico con éxito para identificar células y tejidos sanos y enfermos *in vivo*.

Muchos polipéptidos pueden proporcionar funcionalidad de dirección a células específicas. La afinidad selectiva de determinados polipéptidos puede usarse para dirigirse a casi cualquier célula o tejido deseado, por ejemplo, una célula que expresa un antígeno. Un polipéptido puede portar una carga útil molecular para ralentizar o destruir la célula o el tejido diana. Por tanto, se han empleado polipéptidos en la terapia de afecciones tales como el cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y el rechazo de trasplantes.

En determinadas aplicaciones, los polipéptidos terapéuticos están unidos a escudos moleculares para aumentar su vida útil dentro de un organismo. También se han empleado polipéptidos como instrumentos diagnósticos. Estos polipéptidos pueden portar un marcador para indicar la presencia de un receptor diana en una célula o en un tejido. Estos marcadores normalmente están unidos a los polipéptidos mediante enlaces covalentes.

Hasta la fecha, las técnicas para unir polipéptidos con entidades moleculares tales como cargas útiles moleculares, incluyendo escudos y marcadores moleculares, han estado limitadas por su heterogeneidad en el grado y la ubicación de los enlaces a los polipéptidos, por sus bajos rendimientos y por pérdidas de actividad. Los sitios de conjugación típicos incluyen ubicaciones aleatorias en cadenas polipeptídicas, por ejemplo, aminas aleatorias en cadenas laterales de aminoácidos y el extremo N de determinadas cadenas polipeptídicas. En dichas técnicas, algunos polipéptidos podrían unirse al conjugado en una ubicación, mientras que algunos polipéptidos se unen al mismo conjugado en otra ubicación y algunos polipéptidos podrían no unirse en absoluto.

Documento WO2010/139948 y Nguyen *et al* (2009) JACS. 131: 8720-21 enseñan aminoácidos derivados de lisina que comprenden un grupo azido que puede incorporarse en polipéptidos. Johansson *et al* (2012) European Journal of Organic Chemistry 23: 4267-81 desvela la derivatización de cadenas laterales de aminoácidos con restos de azidoalquileo a través de un enlace de amida o carbamato.

El documento WO2008/134761 describe polipéptidos modificados que comprenden grupos de dirección funcionalizados de una manera adecuada para la química clic, en donde los grupos de dirección comprenden restos azido. De manera similar, el documento WO2008/030558 enseña polipéptidos de plasma o armazones de FC modificados mediante aminoácidos no naturales que contienen grupos funcionales azido.

Existe la necesidad, por lo tanto, de polipéptidos modificados en posiciones específicas de sitio optimizadas para uniformidad, rendimiento y/o actividad, para impulsar el uso prometedor de polipéptidos en, por ejemplo, terapia y diagnóstico.

**Sumario**

En un aspecto, se proporcionan en el presente documento aminoácidos modificados (es decir, compuestos) como se definen en las reivindicaciones, polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los aminoácidos modificados, y métodos para producir los polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los aminoácidos modificados. Los polipéptidos, anticuerpos y conjugados son útiles en los métodos de tratamiento y prevención, métodos de detección y métodos de diagnóstico.

En realizaciones particulares, se proporcionan conjugados de los polipéptidos y cargas útiles. En realizaciones adicionales, se proporcionan conjugados de los anticuerpos y cargas útiles.

En otro aspecto, se proporciona un ARNt ortogonal aminoacilado con un resto de aminoácido como se define en las reivindicaciones. En un aspecto relacionado, se proporciona un método para producir un polipéptido, que comprende poner en contacto un polipéptido con un ARNt ortogonal aminoacilado con un resto de aminoácido como se define

en las reivindicaciones.

Los compuestos de fórmula I descritos en el presente documento pueden incorporarse en cualquier polipéptido conocido por los expertos en la materia. Dichos polipéptidos incluyen, pero sin limitación, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, enzimas y ácidos nucleicos.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un esquema de la reacción de los compuestos (30), (40) y (50) con el compuesto (60).

La figura 2 proporciona una gráfica de  $k_{obs}$  frente a [Azida] para la reacción del compuesto (30), compuesto (40) y compuesto (50) con el compuesto (60). En la figura 2,  $k_{obs}$  se traza sobre el eje vertical en unidades de  $s^{-1}$  de 0 a 0,006 y [Azida] se traza sobre el eje horizontal en unidades de mM de 0 a 3. En la figura 2, los resultados para el compuesto (30) se proporcionan como círculos abiertos, los resultados para el compuesto (40) se proporcionan como triángulos rellenos y los resultados para el compuesto (50) se proporcionan como círculos rellenos. Como se indica en la figura 2, los compuestos (30) y (40) presentaron una constante de velocidad de primer orden de  $1,4 M^{-1} s^{-1}$ , aproximadamente 7 veces mayor que la constante de velocidad de primer orden de  $0,2 M^{-1} s^{-1}$  para el compuesto (50).

La figura 3 proporciona una gráfica de una evolución temporal para la incorporación de pAMF en el sitio Y50TAG en GFP. En la figura 3, URF se traza sobre el eje vertical de 0 a 400000 y el tiempo se traza sobre el eje horizontal en unidades de minutos de 0 a 600. En la figura 3, los resultados para turboGFP se proporcionan como cuadrados rellenos (arriba), los resultados para pCNFRS D286R pAMF se proporcionan como rombos rellenos (centro) y los resultados para Y50TAG se proporcionan como triángulos rellenos (abajo). Como se indica en la figura 3, turboGFP es de aproximadamente 250.000 URF a los 200 minutos, pCNFRS D286R pAMF es de aproximadamente 130.000 URF a los 200 minutos e Y50TAG es de aproximadamente 0 URF a los 200 minutos. Como se indica en la figura 3, turboGFP es de aproximadamente 340.000 URF a los 400 minutos, pCNFRS D286R pAMF es de aproximadamente 160.000 URF a los 400 minutos e Y50TAG es de aproximadamente 0 URF a los 400 minutos. Como se indica en la figura 3, turboGFP es de aproximadamente 370.000 URF a los 600 minutos, pCNFRS D286R pAMF es de aproximadamente 170.000 URF a los 600 minutos e Y50TAG es de aproximadamente 0 URF a los 600 minutos.

La figura 4 proporciona una gráfica de la fracción de DBCO-NH<sub>2</sub> (61) restante frente al tiempo (horas) durante una reacción con los análogos de aminoácidos (30), (1) y (2). En la figura 4, la fracción de DBCO-NH<sub>2</sub> (61) restante se traza sobre el eje vertical en un valor sin unidades de 0 a 1,2 y el tiempo se traza sobre el eje horizontal en unidades de 0 horas a 20 horas. En la figura 4, los resultados para el compuesto (30) se proporcionan como diamantes rellenos, los resultados para el compuesto (1) se proporcionan como cuadrados rellenos y los resultados para el compuesto (2) se proporcionan como triángulos rellenos. Como se indica en la figura 4, los compuestos (1) y (30) reaccionaron con el compuesto (61) a velocidades comparables, mientras que la velocidad de reacción entre el compuesto (2) y el compuesto (61) fue de dos a cuatro veces más lenta que la velocidad de reacción entre los compuestos (1) y (61) y los compuestos (30) y (61).

### Descripción de realizaciones ilustrativas

En el presente documento se proporcionan compuestos definidos por las reivindicaciones, polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los restos de aminoácidos correspondientes a los compuestos de las reivindicaciones y métodos para producir los polipéptidos, anticuerpos y conjugados que comprenden los restos de aminoácidos modificados correspondientes a los compuestos definidos por las reivindicaciones.

#### Definiciones

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

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo saturado, lineal o ramificado. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo es un hidrocarburo primario, secundario o terciario. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo incluye de uno a diez átomos de carbono, es decir, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>. En ciertos casos, el grupo alquilo se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CFCl<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>Cl, etilo, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, *t*-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como sin sustituir, incluyendo grupos alquilo halogenados. En ciertos casos, el grupo alquilo es un grupo alquilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo,

amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario, como es conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

5 La expresión "alquilo inferior", como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a un hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono, es decir, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>. En ciertos casos, el grupo alquilo inferior es un hidrocarburo primario, secundario o terciario. El término incluye restos tanto sustituidos como sin sustituir.

10 El término "cicloalquilo", como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo cíclico saturado. En ciertos casos, el grupo cicloalquilo puede ser un grupo saturado y/o puentado y/o no puentado y/o un bicíclico condensado. En determinadas realizaciones, el grupo cicloalquilo incluye de tres a diez átomos de carbono, es decir, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub>. En algunos casos, el cicloalquilo tiene de 3 a 15 (C<sub>3-15</sub>), de 3 a 10 (C<sub>3-10</sub>) o de 3 a 7 (C<sub>3-7</sub>) átomos de carbono. En ciertos casos, el grupo cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, cicloheptilo, biciclo[2.1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, decalinilo o adamantilo. El término incluye grupos cicloalquilo sustituidos y sin sustituir, incluyendo grupos cicloalquilo halogenados. En ciertos casos, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo cicloalquilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario.

25 "Alquilenilo" se refiere a grupos hidrocarburo alifáticos saturados divalentes, que tienen particularmente de uno a once átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificados. En determinadas realizaciones, el grupo alquilenilo contiene de 1 a 10 átomos de carbono. El término incluye restos tanto sustituidos como sin sustituir. Este término se ilustra por grupos tales como metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), los isómeros de propileno (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-), y similares. El término incluye grupos alquilenilo halogenados. En determinadas realizaciones, el grupo alquilenilo es un grupo alquilenilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquilenilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, alquilarilo, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato y fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario.

35 "Alquenilo" se refiere a grupos hidrocarburo olefínicamente insaturados, monovalentes, en determinados casos, que tienen hasta aproximadamente 11 átomos de carbono, de 2 a 8 átomos de carbono o de 2 a 6 átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificados y que tienen al menos 1 o de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. El término incluye restos tanto sustituidos como sin sustituir. Los grupos alquenilo a modo de ejemplo incluyen etenilo (es decir, vinilo o -CH=CH<sub>2</sub>), n-propenilo (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), isopropenilo (-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>), y similares. El término incluye grupos alquenilo halogenados. En ciertos casos, el grupo alquenilo es un grupo alquenilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquenilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario.

45 El término "cicloalquenilo", como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo cíclico insaturado. En determinadas realizaciones, cicloalquenilo se refiere a sistemas de anillo mono- o multicíclicos que incluyen al menos un doble enlace. En ciertos casos, el grupo cicloalquenilo puede ser un grupo puentado, no puentado y/o uno bicíclico condensado. En determinadas realizaciones, el grupo cicloalquilo incluye de tres a diez átomos de carbono, es decir, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub>. En algunos casos, el cicloalquenilo tiene de 3 a 7 (C<sub>3-10</sub>) o de 4 a 7 (C<sub>3-7</sub>) átomos de carbono. El término incluye grupos cicloalquenilo tanto sustituidos como sin sustituir, incluyendo grupos cicloalquenilo halogenados. En ciertos casos, el grupo cicloalquenilo es un grupo cicloalquenilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo cicloalquenilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario.

60 "Alquilenilo" se refiere a grupos hidrocarburo olefínicamente insaturados, divalentes, en determinados casos, que tienen hasta aproximadamente 11 átomos de carbono o de 2 a 6 átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificados y que tienen al menos 1 o de 1 a 2 sitios de insaturación olefínica. Este término se ilustra mediante grupos, tales como etenileno (-CH=CH-), los isómeros de propenileno (por ejemplo, -CH=CHCH<sub>2</sub>- y -C(CH<sub>3</sub>)=CH- y -CH=C(CH<sub>3</sub>-) y similares. El término incluye grupos alquilenilo tanto sustituidos como sin sustituir, incluyendo grupos alquilenilo halogenados. En ciertos casos, el grupo alquilenilo es un grupo alquilenilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquilenilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto

sin proteger como protegidos según sea necesario.

"Alquinilo" se refiere grupos hidrocarburo acetilénicamente insaturados, en determinadas realizaciones, que tienen hasta aproximadamente 11 átomos de carbono o de 2 a 6 átomos de carbono, que pueden ser de cadena lineal o ramificados y que tienen al menos 1 o de 1 a 2 sitios de insaturación de alquinilo. Los ejemplos no limitantes de grupos alquinilo incluyen acetilénico, etinilo ( $-C\equiv CH$ ), propargilo ( $-CH_2C\equiv CH$ ) y similares. El término incluye grupos alquinilo tanto sustituidos como sin sustituir, incluyendo grupos alquinilo halogenados. En determinadas realizaciones, el grupo alquinilo es un grupo alquinilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede estar sustituido el grupo alquinilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, carbonilo, sulfanilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario.

El término "arilo", como se usa en el presente documento y a menos que se especifique lo contrario, se refiere a fenilo, bifenilo o naftilo. El término incluye restos tanto sustituidos como sin sustituir. Un grupo arilo puede estar sustituido con cualquier resto descrito, incluyendo, pero sin limitación, uno o más restos seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), alquilo, haloalquilo, hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, tanto sin proteger como protegidos según sea necesario, como es conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, segunda edición, 1991.

"Alcoxi" se refiere al grupo  $-OR'$ , donde  $R'$  es alquilo o cicloalquilo. Los grupos alcoxi incluyen, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, *terc*-butoxi, *sec*-butoxi, n-pentoxi, n-hexoxi, 1,2-dimetilbutoxi, y similares.

"Alcoxycarbonilo" se refiere a un radical  $-C(O)$ -alcoxi, donde el alcoxi es como se define en el presente documento.

"Amino" se refiere al radical  $-NH_2$ .

"Carboxilo" o "carboxi" se refiere al radical  $-C(O)OH$ .

El término "alquilamino" o "arilamino" se refiere a un grupo amino que tiene uno o dos sustituyentes alquilo o arilo, respectivamente. En ciertos casos, el sustituyente alquilo es alquilo inferior. En otra realización, el alquilo o alquilo inferior está sin sustituir.

"Halógeno" o "halo" se refiere a cloro, bromo, flúor o yodo.

"Tioalcoxi" se refiere al grupo  $-SR'$ , donde  $R'$  es alquilo o cicloalquilo.

El término "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico monovalente y/o sistema de anillo multicíclico que contiene al menos un anillo no aromático, en el que uno o más de los átomos en el anillo no aromático son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S o N; y los átomos en el anillo restantes son átomos de carbono. En ciertos casos, el grupo heterociclilo o heterocíclico tiene de 3 a 20, de 3 a 15, de 3 a 10, de 3 a 8, de 4 a 7 o de 5 a 6 átomos en el anillo. Los grupos heterociclilo están enlazados al resto de la molécula a través del anillo no aromático. En determinadas realizaciones, el heterociclilo es un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir un sistema de anillo condensado o puenteado y en el que los átomos de nitrógeno o azufre pueden estar opcionalmente oxidados, los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados y algunos anillos pueden estar parcialmente o totalmente saturados o ser aromáticos. El heterociclilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de un compuesto estable. Los ejemplos de tales radicales heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, azepinilo, benzodioxanilo, benzodioxolilo, benzofuranonilo, benzopiranonilo, benzopiranonilo, benzotetrahidrofuranilo, benzotetrahidrotienilo, benzotiopirano, benzoxazinilo,  $\beta$ -carbolinilo, cromanilo, cromonilo, cinolinilo, cumarinilo, decahidroisoquinolinilo, dihidrobenzoisotiazinilo, dihidrobenzoisoxazinilo, dihidrofurilo, dihidroisoindolilo, dihidropirano, dihidropirazolilo, dihidropirazinilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dioxolanilo, 1,4-ditiano, furanonilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, indolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isocromanilo, isocoumarinilo, isoindolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, oxazolidinonilo, oxazolidinilo, oxiranilo, piperazinilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofurilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidropirano, tetrahidrotienilo, tiamorfolinilo, tiazolidinilo, tetrahidroquinolinilo y 1,3,5-tritiano. En determinadas realizaciones, el grupo heterocíclico también puede estar opcionalmente sustituido según se describe en el presente documento.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico monovalente y/o un grupo aromático multicíclico que contiene al menos un anillo aromático, en el que al menos un anillo aromático contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S y N en el anillo. Los grupos heteroarilo están enlazados al resto de la molécula a través del anillo aromático. Cada anillo de un grupo heteroarilo puede contener uno o dos átomos de O, uno o dos átomos de S y/o de uno a cuatro átomos de N, con la condición de que el número total de heteroátomos

en cada anillo sea cuatro o inferior y cada anillo contenga al menos un átomo de carbono. En ciertos casos, el heteroarilo tiene de 5 a 20, de 5 a 15 o de 5 a 10 átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, furanilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tetrazolilo, triazinilo y triazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzoimidazolilo, benzoisoxazolilo, benzopiranoilo, benzotiadiazolilo, benzotiazolilo, benzotienilo, benzotriazolilo, benzoxazolilo, furopiridilo, imidazopiridinilo, imidazotiazolilo, indolizinoilo, indolilo, indazolilo, isobenzofuranilo, isobenzotienilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, naftiridinilo, oxazolopiridinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, piridopiridilo, pirrolopiridilo, quinolinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, tiadiazolopirimidilo y tienopiridilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo tricíclicos incluyen, pero sin limitación, acridinilo, benzindolilo, carbazolilo, dibenzofuranilo, perimidinilo, fenantrolinilo, fenantridinilo, fenarsazinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo y xantenilo. En determinadas realizaciones, el heteroarilo también puede estar opcionalmente sustituido según se describe en el presente documento.

15 El término "alquilarilo" se refiere a un grupo arilo con un sustituyente de alquilo. El término "aralquilo" o "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente de arilo.

La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, se refiere a un grupo que se añade a un átomo de oxígeno, nitrógeno o fósforo para prevenir su reacción adicional o para otros propósitos. Una amplia diversidad de grupos protectores de oxígeno y nitrógeno es conocida para los expertos en la técnica de síntesis orgánica.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal de un compuesto proporcionado en el presente documento que conserva sus propiedades biológicas y que no es tóxico o de otro modo indeseable para uso farmacéutico. Tales sales pueden obtenerse de diversos contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica. Tales sales incluyen, pero sin limitación: (1) sales de adición de ácidos formadas con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, sulfámico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, propiónico, hexanoico, ciclopentilpropiónico, glicólico, glutámico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, sórbico, ascórbico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, pícrico, cinámico, mandélico, ftálico, láurico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, alcanfórico, alcanforsulfónico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, 3-fenilpropiónico, trimetilacético, *terc*-butilacético, lauril sulfúrico, glucónico, benzoico, glutámico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, ciclohexilsulfámico, quinico, mucónico y ácidos similares; o (2) sales de adición de bases formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor (a) está reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio, o hidróxidos de metal alcalino o metal alcalinotérreo, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, litio, cinc y bario, amoniaco o (b) se coordina con una base orgánica, tales como aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas, tales como amoniaco, metilamina, dimetilamina, dietilamina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etilendiamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletileno-diamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, N-metilglucamina piperazina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen adicionalmente, únicamente a modo de ejemplo y sin limitación, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, y cuando el compuesto contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como hidrohaluros, por ejemplo clorhidrato y bromhidrato, sulfato, fosfato, sulfamato, nitrato, acetato, trifluoroacetato, tricloroacetato, propionato, hexanoato, ciclopentilpropionato, glicolato, glutarato, piruvato, lactato, malonato, succinato, sorbato, ascorbato, malato, maleato, fumarato, tartarato, citrato, benzoato, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoato, picrato, cinamato, mandelato, ftalato, laurato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato, 1,2-etano-disulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), 4-clorobencenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, 4-toluenosulfonato, alcanforato, alcanforsulfonato, 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxilato, glucoheptonato, 3-fenilpropionato, trimetilacetato, *terc*-butilacetato, lauril sulfato, gluconato, benzoato, glutamato, hidroxinaftoato, salicilato, estearato, ciclohexilsulfamato, quinato, muconato y similares.

El término "acilo" o "éster unido a O" se refiere a un grupo de la fórmula C(O)R', en la que R' es alquilo o cicloalquilo (incluyendo alquilo inferior), resto carboxilato de aminoácido, arilo incluyendo fenilo, alcarilo, arilalquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo, tal como fenoximetilo; o alquilo sustituido (incluyendo alquilo inferior), arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con cloro, bromo, flúor, yodo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> o alcoxi C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, ésteres de sulfonato, tales como alquil o arilalquil sulfonilo, incluyendo metanosulfonilo, el éster de mono, di o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, alcarilo, arilalquilo incluyendo bencilo, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, ariloxialquilo, tal como fenoximetilo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden de manera óptima un grupo fenilo. En particular, los grupos acilo incluyen acetilo, trifluoroacetilo, metilacetilo, ciclopropilacetilo, propionilo, butirilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, neo-heptanoilo, fenilacetilo, 2-acetoxi-2-fenilacetilo, difenilacetilo,  $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluorometil-fenilacetilo, bromoacetilo, 2-nitro-bencenoacetilo, 4-cloro-bencenoacetilo, 2-cloro-2,2-difenilacetilo, 2-cloro-2-fenilacetilo, trimetilacetilo, clorodifluoroacetilo, perfluoroacetilo, fluoroacetilo, bromodifluoroacetilo, metoxiacetilo, 2-tiofenoacetilo, clorosulfonilacetilo, 3-metoxifenilacetilo, fenoxiacetilo, *terc*-

butilacetilo, tricloroacetilo, monocloro-acetilo, dicloroacetilo, 7H-dodecafluoro-heptanoílo, perfluoro-heptanoílo, 7H-dodeca-fluoroheptanoílo, 7-clorododecafluoro-heptanoílo, 7-cloro-dodecafluoro-heptanoílo, 7H-dodecafluoroheptanoílo, 7H-dodeca-fluoroheptanoílo, nona-fluoro-3,6-dioxa-heptanoílo, nonafluoro-3,6-dioxaheptanoílo, perfluoroheptanoílo, metoxibenzoílo, metil 3-amino-5-feniltiofeno-2-carboxilo, 3,6-dicloro-2-metoxibenzoílo, 4-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-benzoílo, 2-bromo-propionilo, omega-aminocaprilo, decanoílo, n-pentadecanoílo, estearilo, 3-ciclopentil-propionilo, 1-benceno-carboxilo, O-acetilmandelilo, pivaloil acetilo, 1-adamantano-carboxilo, ciclohexano-carboxilo, 2,6-piridinadicarboxilo, ciclopropano-carboxilo, ciclobutano-carboxilo, perfluorociclohexil carboxilo, 4-metilbenzoílo, clorometil isoxazolil carbonilo, perfluorociclohexil carboxilo, crotonilo, 1-metil-1H-indazol-3-carbonilo, 2-propenilo, isovalerilo, 1-pirrolidinacarbonilo, 4-fenilbenzoílo.

El término "aminoácido" se refiere a  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  aminoácidos de origen natural o sintéticos, e incluye, pero sin limitación, aminoácidos encontrados en proteínas, es decir glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, lisina, arginina e histidina. En determinadas realizaciones, en aminoácido está en la configuración L. Como alternativa, el aminoácido puede ser un derivado de alanilo, valinilo, leucinilo, isoleuccinilo, prolinilo, fenilalaninilo, triptofanilo, metioninilo, glicinilo, serinilo, treoninilo, cisteinilo, tirosinilo, asparaginilo, glutaminilo, aspartoilo, glutaroílo, lisinilo, argininilo, histidinilo,  $\beta$ -alanilo,  $\beta$ -valinilo,  $\beta$ -leucinilo,  $\beta$ -isoleuccinilo,  $\beta$ -prolinilo,  $\beta$ -fenilalaninilo,  $\beta$ -triptofanilo,  $\beta$ -metioninilo,  $\beta$ -glicinilo,  $\beta$ -serinilo,  $\beta$ -treoninilo,  $\beta$ -cisteinilo,  $\beta$ -tirosinilo,  $\beta$ -asparaginilo,  $\beta$ -glutaminilo,  $\beta$ -aspartoilo,  $\beta$ -glutaroílo,  $\beta$ -lisinilo,  $\beta$ -argininilo o  $\beta$ -histidinilo.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácido. 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 polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un aminoácido modificado. Además, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en las que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

La expresión "sustancialmente libre de" o "sustancialmente en ausencia de" con respecto a una composición de nucleósido se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos un 85 o un 90 % en peso, en determinadas realizaciones un 95 %, un 98 %, 99 % o 100 % en peso, del enantiómero designado de ese nucleósido. En determinadas realizaciones, en los métodos y compuestos proporcionados en el presente documento, los compuestos están sustancialmente libres de enantiómeros.

De forma análoga, el término "aislado" con respecto a una composición de nucleósido se refiere a una composición de nucleósido que incluye al menos un 85, 90 %, un 95 %, un 98 %, del 99 % al 100 % en peso, del nucleósido, comprendiendo el resto otras especies químicas o enantiómeros.

"Solvato" se refiere a un compuesto proporcionado en el presente documento o una sal del mismo, que incluye adicionalmente una cantidad estequiométrica o no estequiométrica del disolvente enlazado por fuerzas intramoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

"Composición isotópica" se refiere a la cantidad de cada isótopo presente para un átomo dado, y "composición isotópica natural" se refiere a la composición o abundancia isotópica de origen natural para un átomo dado. Los átomos que contienen su composición isotópica natural también pueden denominarse en el presente documento como átomos "no enriquecidos". A menos que se designe lo contrario, los átomos de los compuestos recitados en el presente documento están destinados a representar cualquier isótopo estable de ese átomo. Por ejemplo, salvo que se indique otra cosa, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene hidrógeno en su composición isotópica natural.

"Enriquecimiento isotópico" se refiere al porcentaje de incorporación de una cantidad de un isótopo específico en un átomo dado en una molécula en lugar de la abundancia isotópica natural del átomo. Por ejemplo, un enriquecimiento de deuterio del 1 % en una posición dada significa que el 1 % de las moléculas en una muestra dada contienen deuterio en la posición especificada. Dado que la distribución natural de deuterio es de aproximadamente el 0,0156 %, el enriquecimiento de deuterio en cualquier posición en un compuesto sintetizado usando materiales de partida no enriquecidos es de aproximadamente el 0,0156 %. El enriquecimiento isotópico de los compuestos proporcionados en el presente documento puede determinarse usando métodos analíticos convencionales conocidos para alguien con una habilidad habitual en la técnica, incluyendo la espectrometría de masas y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

"Isotópicamente enriquecido" se refiere a un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo. "Isotópicamente enriquecido" también puede referirse a un compuesto que contiene al menos un átomo que tiene una composición isotópica distinta de la composición isotópica natural de ese átomo.

Como se usa en la presente memoria, los grupos "alquilo", "cicloalquilo", "alquenilo", "cicloalquenilo", "alquinilo", "arilo", "alcoxi", "alcoxycarbonilo", "amino", "carboxilo", "alquilamino", "arilamino", "tioalquilo", "heterocíclico",

"heteroarilo", "alquilheterocicliilo", "alquilheteroarilo", "acilo", "aralquilo", "alcarilo", "purina", "pirimidina", "carboxilo" y "aminoácido" comprenden opcionalmente deuterio en una o más posiciones donde los átomos de hidrógeno están presentes, y en los que la composición de deuterio del átomo o átomos es distinta de la composición isotópica natural.

5 Además, como se usa en el presente documento, los grupos "alquilo", "cicloalquilo", "alquenilo", "cicloalquenilo", "alquinilo", "arilo", "alcoxi", "alcoxicarbonilo", "carboxilo", "alquilamino", "arilamino", "tioalquilo", "heterocicliilo", "heteroarilo", "alquilheterocicliilo", "alquilheteroarilo", "acilo", "aralquilo", "alcarilo", "purina", "pirimidina", "carboxilo" y "aminoácido" comprenden opcionalmente carbono-13 en una cantidad distinta de la composición isotópica natural.

10 Como se usa en el presente documento, CE<sub>50</sub> se refiere a una dosis, concentración o cantidad de un compuesto de prueba particular que induce una respuesta dependiente de la dosis a 50 % de la expresión máxima de una respuesta particular que se induce, provoca o potencia mediante el compuesto de prueba particular.

15 Como se usa en el presente documento, la CI<sub>50</sub> se refiere a una cantidad, concentración o dosis de un compuesto de prueba particular que logra una inhibición de 50 % de una respuesta máxima en un ensayo que mide dicha respuesta.

20 El término "hospedador", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo unicelular o multicelular en el que un virus puede replicarse, incluyendo líneas celulares y animales y, en determinadas realizaciones, un ser humano. Como alternativa, un hospedador puede portar una parte de un genoma vírico, cuya replicación o función puede ser alterada por los compuestos y composiciones descritos en el presente documento. El término hospedador incluye específicamente células infectadas, células transfectadas con todo o parte de un genoma vírico y animales, en particular, primates (incluidos chimpancés) y seres humanos. En la mayoría de las aplicaciones animales, el hospedador es un paciente humano. Las aplicaciones veterinarias, en determinadas indicaciones, sin embargo, están claramente anticipadas por la presente divulgación (tales como chimpancés).

25 Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento. Los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, tal como un mamífero incluyendo un animal distinto de primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomolgous, un chimpancé y un ser humano) y, por ejemplo, un ser humano. En determinados casos, el sujeto es refractario o no responde a los tratamientos actuales para la infección por hepatitis C. En otro caso, el sujeto es un animal de granja (por ejemplo, un caballo, una vaca, un cerdo, etc.) o una mascota (por ejemplo, un perro o un gato). En determinados casos, el sujeto es un ser humano.

30 Como se usan en el presente documento, las expresiones "agente terapéutico" y "agentes terapéuticos" se refieren a cualquier agente(s) que se puede usar en el tratamiento o la prevención de un trastorno o uno o más de sus síntomas. En determinados casos, la expresión "agente terapéutico" incluye un compuesto proporcionado en el presente documento. En determinados casos, un agente terapéutico es un agente que se sabe que es útil, o se ha usado o se está usando en la actualidad, para el tratamiento o la prevención de un trastorno o uno o más de sus síntomas.

35 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento contra la enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo de, entre otros, el compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

40 "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en determinados casos, a aliviar una enfermedad o trastorno que existe en un sujeto. En otro caso, "tratar" o "tratamiento" incluye mejorar al menos un parámetro físico, que puede ser imperceptible por el sujeto. En otro caso más, "tratar" o "tratamiento" incluye modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma perceptible) o fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En otro caso más, "tratar" o "tratamiento" incluye retrasar la aparición de la enfermedad o trastorno.

45 Como se usan en el presente documento, las expresiones "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" como se usan se refieren a cualquier agente(s) que se puede usar en la prevención de un trastorno o uno o más de sus síntomas. En determinados casos, la expresión "agente profiláctico" incluye un compuesto proporcionado en el presente documento. En otros casos determinados, la expresión "agente profiláctico" no se refiere a un compuesto proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil, o se ha usado o se está usando en la actualidad, para prevenir o impedir el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de un trastorno.

50 Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, agente profiláctico) que es suficiente para dar como resultado la prevención o reducción del desarrollo, reaparición o inicio de uno o más síntomas asociados a un trastorno (o para potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia (por ejemplo, otro agente profiláctico)).



La expresión "sustancialmente puro" con respecto a una composición que comprende un resto de aminoácido modificado se refiere a una composición que incluye al menos el 80, 85, 90 o 95 % en peso o, en determinadas realizaciones, el 95, 98, 99 o 100 % en peso, por ejemplo, peso seco, del resto de aminoácido modificado con respecto a la parte restante de la composición. El porcentaje en peso puede ser con respecto al peso total de proteína en la composición o con respecto al peso total de restos de aminoácidos modificados en la composición. La pureza puede determinarse mediante técnicas evidentes para los expertos en la materia.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier macromolécula que los expertos en la materia reconocerían como un anticuerpo. Los anticuerpos comparten propiedades comunes que incluyen la unión y al menos una cadena polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una cadena polipeptídica que puede estar codificada por cualquiera de los genes de inmunoglobulina reconocidos por los expertos en la materia. Los genes de inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, los genes de región constante  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4),  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$ , así como los genes de regiones variables de inmunoglobulinas. El término incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos reconocidos por los expertos en la materia, y variantes de los mismos.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a cualquier forma de un anticuerpo distinto de la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos en el presente documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de anticuerpos de longitud completa y anticuerpos que se han obtenido por ingeniería genética. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fc, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, Fv monocatenario (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco conservadas, regiones constantes y similares (Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402).

El término "inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por uno de los genes de inmunoglobulina o una proteína sustancialmente idéntica a la misma en su secuencia de aminoácidos. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener varias formas estructurales, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales incluyendo, pero sin limitación, V<sub>H</sub>, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>.

La expresión "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se refiere a un dominio de proteína que consiste en un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina. Los dominios de Ig incluyen, pero sin limitación, V<sub>H</sub>, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub>.

La expresión "región variable" de un anticuerpo se refiere a un polipéptido o polipéptidos compuestos por el dominio de inmunoglobulina V<sub>H</sub>, los dominios de inmunoglobulina V<sub>L</sub> o los dominios de inmunoglobulina V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. La región variable puede referirse a este o estos polipéptidos aislados, como un fragmento Fv, como un fragmento scFv, como esta región en el contexto de un fragmento de anticuerpo mayor o como esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o una molécula de armazón alternativa que no sea de anticuerpo.

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

Los dominios constantes normalmente no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, solo se sabe que IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas activan el complemento.

El término "conjugado" se refiere a cualquier resto que se puede conectar a un resto de aminoácido modificado como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las expresiones "conjugado" y "carga útil" se usan indistintamente. Un conjugado puede ser una molécula pequeña o una macromolécula. En algunas

realizaciones, el conjugado es una molécula bioactiva, incluyendo, pero sin limitación, una proteína, un péptido, un activo nucleico o un híbrido de los mismos. En algunas realizaciones, el conjugado es un polímero tal como polietilenglicol. En algunas realizaciones, un conjugado es un agente terapéutico, incluyendo un fármaco disponible en el mercado. En algunas realizaciones, un conjugado es un marcador que puede reconocer y unirse a dianas específicas, tales como una carga útil molecular que es perjudicial para las células diana o un marcador útil para la detección o el diagnóstico. En algunas realizaciones, el conjugado está conectado a un resto de aminoácido modificado a través de un enlazador. En algunas realizaciones, el conjugado está directamente conectado a un resto de aminoácido modificado sin un enlazador.

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

La expresión "anticuerpo parental" se refiere a un anticuerpo conocido por los expertos en la materia que se modifica según la descripción proporcionada en el presente documento. La modificación puede ser física, es decir, el reemplazo o modificación de forma química o bioquímica de uno o más aminoácidos del anticuerpo parental para producir un anticuerpo dentro del alcance de la presente descripción. La modificación también puede ser conceptual, es decir, utilizar la secuencia de una o más cadenas polipeptídicas del anticuerpo parental para diseñar un anticuerpo que comprenda uno o más aminoácidos modificados específicos de sitio según la presente descripción. Los anticuerpos parentales pueden ser anticuerpos de origen natural o anticuerpos diseñados o desarrollados en un laboratorio. Los anticuerpos parentales también pueden ser anticuerpos artificiales u obtenidos por ingeniería genética, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados.

La expresión "variante modificada de forma conservativa" se refiere a una proteína que difiere de una proteína relacionada en sustituciones conservativas en la secuencia de aminoácidos. Un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de péptido, polipéptido o proteína que alteran, añaden o suprimen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son adicionales a, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos.

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).

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

Los términos "idéntica" o "identidad", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente 60 % de identidad, opcionalmente aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de identidad sobre una región específica), cuando se comparan y se alinean para determinar la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o una región designada según lo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Puede existir identidad sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud o sobre una región que tiene 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud o, donde no se especifique, a lo largo de la secuencia completa o un polipéptido. En el caso de los anticuerpos, la identidad puede medirse fuera de las CDR variables. Puede realizarse

alineamiento óptimo de secuencias para la comparación, incluyendo, pero sin limitación, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10 y alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado. En algunos casos, el algoritmo BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" activado.

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

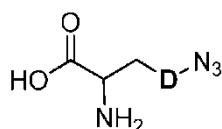
El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y origen no natural, así como aminoácidos tales como prolina, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural.

Los aminoácidos codificados de forma natural son los aminoácidos proteínogénicos conocidos por los expertos en la materia. Incluyen los 20 aminoácidos habituales (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y los menos habituales pirrolisina y selenocisteína. Los aminoácidos codificados de forma natural incluyen variantes postraduccionales de los 22 aminoácidos de origen natural, tales como aminoácidos prenilados, aminoácidos isoprenilados, aminoácidos miristoilados, aminoácidos palmitoilados, aminoácidos N-glucosilados, aminoácidos O-glucosilados, aminoácidos fosforilados y aminoácidos acilados.

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

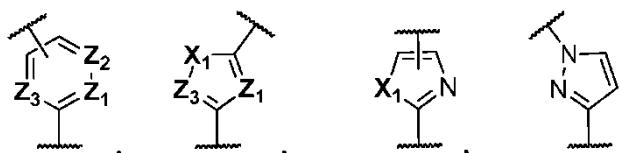
### Compuestos

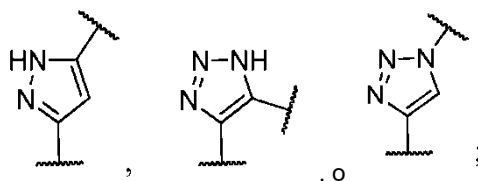
En el presente documento, se describen compuestos de acuerdo con la fórmula I:



Fórmula I;

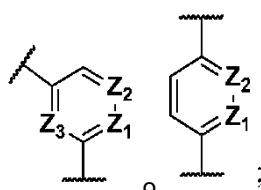
o una de sus sales, en la que: **D** es **-Ar-W<sub>3</sub>-** o **-W<sub>1</sub>-Y<sub>1</sub>-C(O)-Y<sub>2</sub>-W<sub>2</sub>-**; **Ar** es



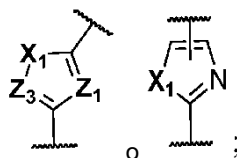


5 cada uno de  $W_1$ ,  $W_2$  y  $W_3$  es independientemente un enlace sencillo o alqueno inferior; cada  $X_1$  es independientemente -NH-, -O- o -S-; cada  $Y_1$  es independientemente un enlace sencillo, -NH- u -O-; cada  $Y_2$  es independientemente un enlace sencillo, -NH-, -O- o un pirrolidinileno unido en N o unido en C; y uno de  $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_3$  es -N- y los otros de  $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_3$  son independientemente -CH-.

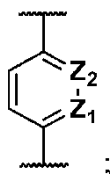
10 En un caso,  $D$  es -Ar- $W_3$ -; y  $Ar$  y  $W_3$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En un caso particular,  $D$  es -Ar- $W_3$ -; y  $Ar$  es



15 y  $Ar$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $W_3$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En ciertos casos,  $D$  es -Ar- $W_3$ -; y  $Ar$  es



y  $Ar$ ,  $Z_1$ ,  $Z_3$ ,  $X_1$  y  $W_3$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En ciertos casos,  $D$  es -Ar- $W_3$ -;  $W_3$  es -CH<sub>2</sub>-; y  $Ar$  es



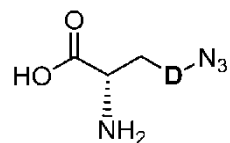
20

donde  $Z_1$  y  $Z_2$  son como se definen en el contexto de la fórmula I.

25 En un caso,  $D$  es - $W_1$ - $Y_1$ -C(O)- $Y_2$ - $W_2$ -; y  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $Y_1$  y  $Y_2$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En casos particulares,  $D$  es - $W_1$ - $Y_1$ -C(O)- $Y_2$ - $W_2$ -; y cada  $Y_1$  es independientemente -NH- u -O-; y  $W_1$ ,  $W_2$  y  $Y_2$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En ciertos casos,  $D$  es - $W_1$ - $Y_1$ -C(O)- $Y_2$ - $W_2$ -; cada  $Y_2$  es independientemente un pirrolidinileno unido en N o unido en C; y cada  $W_2$  es un enlace sencillo; y  $W_1$  y  $Y_1$  son como se definen en el contexto de la fórmula I. En un caso particular,  $D$  es - $W_1$ - $Y_1$ -C(O)- $Y_2$ - $W_2$ -; cada  $Y_2$  es independientemente un enlace sencillo, -NH- u -O-; y cada  $W_2$  es alqueno inferior; y  $W_1$  y  $Y_1$  son como se definen en el contexto de la fórmula I.

30

En un caso, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula la:

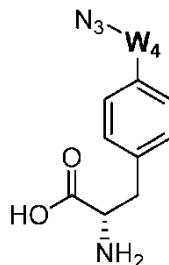


5 Fórmula Ia;

donde **D** es como se define en el contexto de la fórmula I.

10 En un caso, se proporcionan compuestos de las fórmulas I y Ia, en los que cada uno de **W<sub>2</sub>** y **W<sub>3</sub>** es independientemente alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. En otro caso, se proporcionan compuestos de las fórmulas I y Ia, en los que cada uno de **W<sub>2</sub>** y **W<sub>3</sub>** es independientemente alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.

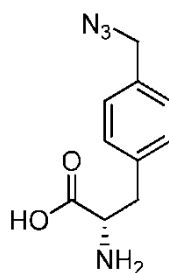
En una realización, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula II:



15 Fórmula II;

20 o una de sus sales, en la que **W<sub>4</sub>** es alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. En una realización adicional, **W<sub>4</sub>** es alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. En una realización, **W<sub>4</sub>** es alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. En una realización, **W<sub>4</sub>** es alquileo C<sub>1</sub>.

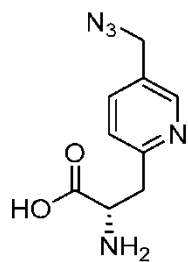
En una realización, se proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 30:



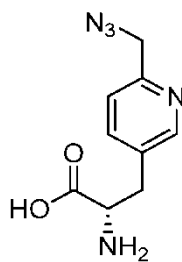
(30);

25 o una de sus sales.

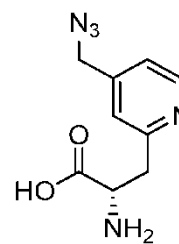
En un caso, se proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las fórmulas 1-29 y 40:



(1)

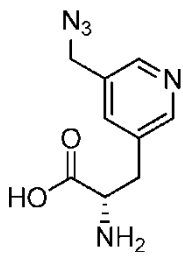


(2)

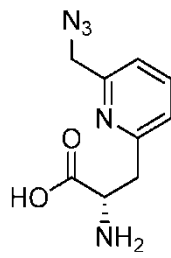


(3)

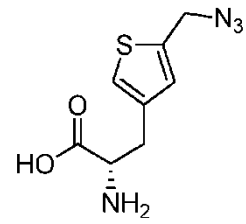
30



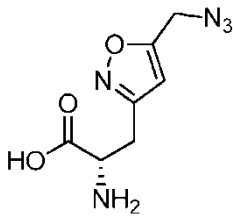
(4)



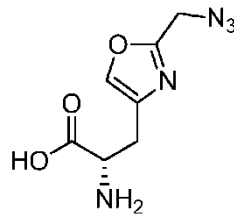
(5)



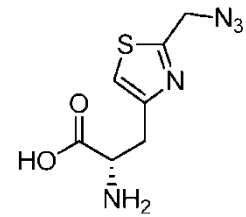
(6)



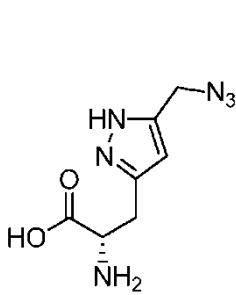
(7)



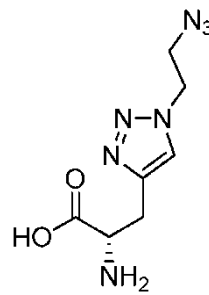
(8)



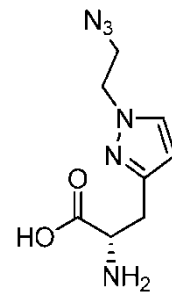
(9)



(10)

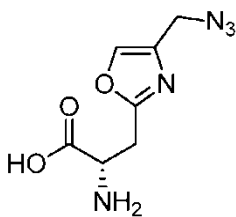


(11)

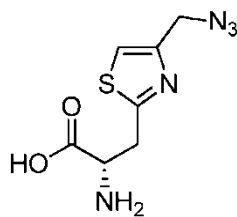


(12)

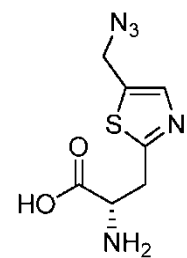
5



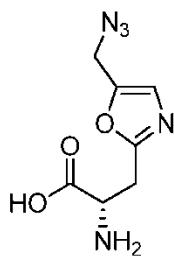
(13)



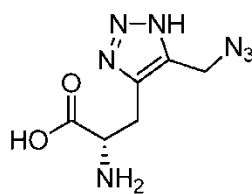
(14)



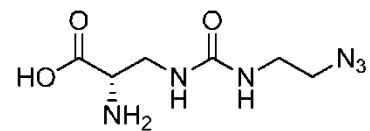
(15)



(16)

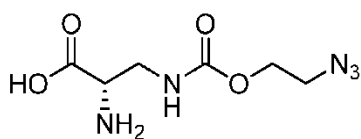


(17)

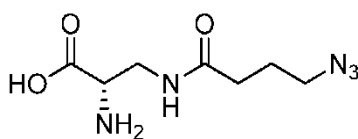


(18)

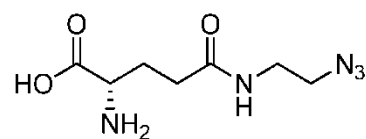
10



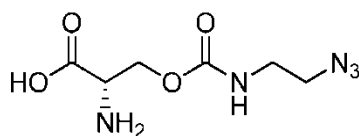
(19)



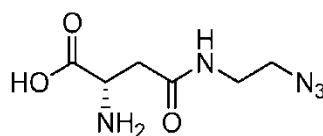
(20)



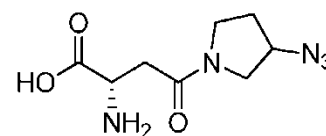
(21)



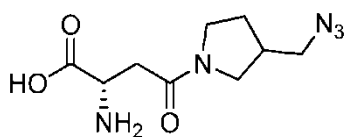
(22)



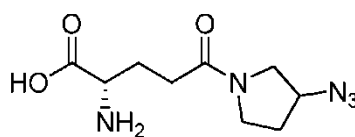
(23)



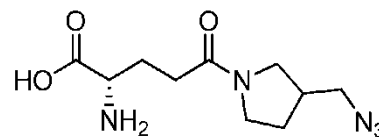
(24)



(25)

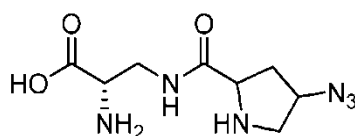


(26)

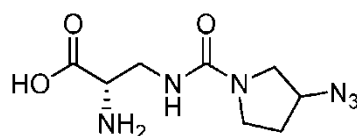


(27)

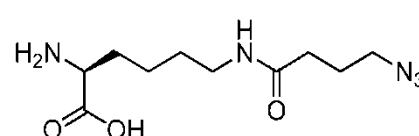
5



(28)



(29)



(40);

o una de sus sales.

10

En una realización, se proporciona un polipéptido que comprende un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30. En una realización, se proporciona un conjugado que comprende un polipéptido que comprende un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30 unido a una carga útil y que comprende opcionalmente un resto de enlace entre el polipéptido y la carga útil.

15

En una realización, se proporciona un anticuerpo que comprende un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30. En una realización, se proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo que comprende un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30 unido a una carga útil y que comprende opcionalmente un resto de enlace entre el anticuerpo y la carga útil.

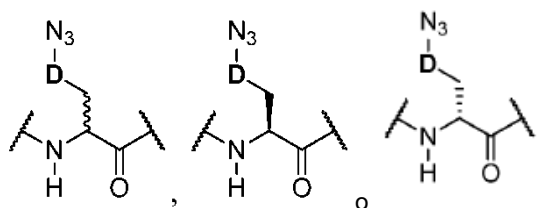
20

En una realización, se proporciona un ARNt ortogonal aminoacilado con un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30. En una realización relacionada, se proporciona un método para producir un polipéptido, que comprende poner en contacto un polipéptido con un ARNt ortogonal aminoacilado con un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30 en condiciones adecuadas para incorporar el resto de aminoácido en el polipéptido. En una realización, la base de ARNt ortogonal se empareja con un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido. En otra realización, el contacto se produce en una mezcla de reacción que comprende una ARNt sintetasa capaz de aminoacilar el ARNt ortogonal con un compuesto de fórmula II o 30.

25

30

En ciertos casos, se proporciona un polipéptido que comprende un resto de aminoácido modificado de acuerdo con cualquiera de las siguientes fórmulas, donde **D** es como se define en el contexto de la fórmula I:



35

Los expertos en la materia reconocerán que las proteínas están compuestas generalmente de L-aminoácidos. Sin embargo, con aminoácidos modificados, los presentes métodos y composiciones proporcionan al facultativo la

capacidad de usar L-, D- o aminoácidos modificados racémicos. En ciertos casos, los aminoácidos modificados descritos en el presente documento incluyen versiones D de los aminoácidos naturales y versiones racémicas de los aminoácidos naturales.

#### 5 *Reacción de Ciclación de Huisgen*

Ventajosamente, los aminoácidos modificados que comprenden grupos azido, tales como compuestos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I, Ia, II, 1-30 o 40, descritos en el presente documento y los polipéptidos que los comprenden facilitan reacciones selectivas y eficientes con un segundo compuesto que comprende un grupo alquino. Se cree que los grupos azido y alquino reaccionan en una reacción de cicloadición 1,3-dipolar para formar un resto 1,2,3-triazolileno que une el aminoácido modificado (o polipéptido que comprende el aminoácido modificado) al segundo compuesto. Esta reacción entre una azida y alquino para formar un triazol es generalmente dentro de la técnica como una reacción de cicloadición de Huisgen.

La reactividad exclusiva de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y de otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente las azidas alifáticas, y los alquinos son generalmente estables frente a las condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto los grupos funcionales azida como los alquinos son inertes frente a las cadenas laterales (es decir, los grupos R) de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en los polipéptidos de origen natural. Cuando se sitúan próximos, sin embargo, la naturaleza "propensa a reaccionar" de los grupos azida y alquino y reaccionan de forma selectiva y eficaz a través de la reacción de cicloadición [3+2] de Huisgen para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin J., et al., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, por ejemplo, Padwa, A., en *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), pág. 1069-1109; Huisgen, R. en *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), pág. 1-176) en lugar de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos no codificados de forma natural que portan azida y cadenas laterales que contienen alquinos permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido no codificado de forma natural. La reacción de cicloadición que implica compuestos que contienen azida o alquino puede realizarse a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (incluyendo, pero sin limitación, en forma de una cantidad catalítica de CuSO<sub>4</sub>) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en una cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornøe, C. W., et al., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Los agentes reductores a modo de ejemplo incluyen, incluyendo, pero sin limitación, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, y un potencial eléctrico aplicado.

#### *Polipéptidos*

En el presente documento se proporcionan polipéptidos que comprenden uno o más restos de aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios en una secuencia de aminoácidos de al menos una cadena polipeptídica. En una realización, las composiciones son anticuerpos que comprenden uno o más restos de aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios en la secuencia de aminoácidos de al menos una cadena polipeptídica.

El polipéptido puede compartir alta identidad de secuencia con cualquier polipéptido reconocido por los expertos en la materia, es decir, un polipéptido parental. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental, aparte de los aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios. En realizaciones adicionales, el polipéptido proporcionado en el presente documento puede tener una o más inserciones, supresiones o mutaciones con respecto al polipéptido parental además del o los aminoácidos modificados en las posiciones específicas de sitios. En determinadas realizaciones, el polipéptido proporcionado en el presente documento puede tener una secuencia primaria particular, siempre que sea reconocido como un polipéptido por los expertos en la materia. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento proporcionan la incorporación de al menos un aminoácido modificado en un polipéptido. El aminoácido modificado puede estar presente en cualquier ubicación en el polipéptido, incluyendo cualquier posición terminal o cualquier posición interna del polipéptido. Preferentemente, el aminoácido modificado no destruye la actividad y/o la estructura terciaria del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácidos de origen natural homólogo, a menos que dicha destrucción de la actividad y/o la estructura terciaria sea uno de los fines de la incorporación del aminoácido modificado en el polipéptido. Además, la incorporación del aminoácido modificado en el polipéptido puede modificar en cierta medida la actividad (por ejemplo, manipular la eficacia terapéutica del polipéptido, mejorar el perfil de seguridad del polipéptido, ajustar la farmacocinética, farmacología y/o farmacodinámica del polipéptido (por ejemplo, aumentar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, aumentar la semivida en suero, aumentar la semivida terapéutica, modular la inmunogenicidad,



modular la actividad biológica o alargar el tiempo en circulación), proporcionar funcionalidad adicional al polipéptido, incorporar una etiqueta, marcador o señal detectable en el polipéptido, facilitar las propiedades de aislamiento del polipéptido y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas anteriormente) y/o la estructura terciaria del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácidos de origen natural homólogo sin causar la destrucción total de la actividad y/o la estructura terciaria. Dichas modificaciones de la actividad y / o la estructura terciaria son a menudo uno de los objetivos de efectuar tales incorporaciones, aunque la incorporación del aminoácido modificado en el polipéptido también puede tener poco efecto sobre la actividad y/o la estructura terciaria del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácidos de origen natural homólogo. De forma correspondiente, los polipéptidos de aminoácidos modificados, composiciones que comprenden polipéptidos de aminoácidos modificados, métodos para preparar tales polipéptidos y composiciones de polipéptidos, métodos para purificar, aislar y caracterizar dichos polipéptidos y composiciones de polipéptidos, y los métodos para usar dichos polipéptidos y composiciones de polipéptidos se consideran dentro del alcance de la presente divulgación. Además, los polipéptidos de aminoácidos modificados descritos en el presente documento también pueden ligarse a otro polipéptido (incluyendo, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido modificado o un polipéptido de aminoácido de origen natural).

Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritos en el presente documento no se limitan a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. De hecho, prácticamente cualquier polipéptido puede incluir al menos un aminoácido modificado descrito en el presente documento. Únicamente a modo de ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo de una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: antitripsina alfa-1, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético auricular, polipéptido natriurético auricular, péptido auricular, quimiocina C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando de c-kit, citocina, quimiocina CC, proteína quimioatrayente de monocitos 1, proteína quimioatrayente de monocitos 2, proteína quimioatrayente de monocitos 3, proteína inflamatoria de monocitos 1 alfa, proteína inflamatoria de monocitos 1 beta, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando de CD40, ligando de c-kit, colágeno, factor estimulante de colonias (CSF), factor de complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor del complemento 1, citocina, 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 de haz de cuatro hélices, G-CSF, glp-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, factor de crecimiento, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), hirudina, hormona del crecimiento humana (hGH), seroalbúmina humana, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, interleucina (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), lactoferrina, factor 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 pirógena A, exotoxina pirógena B, exotoxina pirógena C, pyy, relaxina, renina, SCF, proteína biosintética pequeña, receptor del complemento soluble I, I-CAM 1 soluble, receptor de interleucina soluble, receptor de TNF soluble, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptocinasa, superantígenos, enterotoxina estafilocócica, SEA, SEB, SECT, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormonas esteroideas, superóxido dismutasa, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador del plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), urocinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona. En una realización relacionada o adicional, el polipéptido de aminoácidos modificados también puede ser homólogo de cualquier miembro polipeptídico de la familia supergénica de la hormona del crecimiento.

En determinadas realizaciones, los aminoácidos modificados pueden estar en cualquier posición dentro del polipéptido, en el extremo N, en el extremo C o dentro del polipéptido. En realizaciones ventajosas, los aminoácidos modificados se sitúan en ubicaciones seleccionadas en un polipéptido. Se identifican que estas ubicaciones proporcionan sitios óptimos para sustitución con los aminoácidos modificados. Cada sitio es capaz de portar un aminoácido modificado con una estructura, función y/o métodos para producir el polipéptido óptimos.

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

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que tiene propiedades funcionales óptimas. Por ejemplo, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de afinidad de unión por su diana, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar unión potenciada en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo y la diana es un antígeno.

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que puede prepararse provechosamente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido muestra

propiedades ventajosas en sus métodos de síntesis, analizados en el presente documento. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de rendimiento en la producción, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar rendimiento de producción potenciado en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de supresión de ARNt, descrita en el presente documento, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar una supresión de ARNt potenciada, descrita en el presente documento, en producción en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que tiene solubilidad ventajosa. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de solubilidad, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar solubilidad potenciada en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que tiene expresión ventajosa. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de expresión, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar expresión potenciada en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que tiene plegamiento ventajoso. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar poca o ninguna pérdida de plegamiento, en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar plegamiento potenciado en comparación con un polipéptido sin el aminoácido modificado específico de sitio. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, una posición específica de sitio para sustitución proporciona un polipéptido que tiene capacidad de conjugación ventajosa. Como se describe en el presente documento, varios aminoácidos modificados tienen cadenas laterales o grupos funcionales que facilitan la conjugación del polipéptido con un segundo agente, directamente o a través de un enlazador. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar eficacia de conjugación potenciada, en comparación con un polipéptido sin los mismos u otros aminoácidos modificados en otras posiciones. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar rendimiento de conjugación potenciado, en comparación con un polipéptido sin los mismos u otros aminoácidos modificados en otras posiciones. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede mostrar especificidad de conjugación potenciada, en comparación con un polipéptido sin los mismos u otros aminoácidos modificados en otras posiciones. En determinados aspectos de esta realización, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, se proporcionan además en el presente documento variantes modificadas de forma conservativa de los polipéptidos y anticuerpos descritos en el presente documento. Las variantes modificadas de forma conservativa de un polipéptido incluyen una o más inserciones, supresiones o sustituciones que no alteran la estructura y/o la función del polipéptido cuando son evaluadas por un experto en la materia. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 20 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 15 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 10 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 9 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 8 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 7 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 6 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 5 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 4 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 3 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 2 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas de forma conservativa incluyen 1 inserción, supresión o sustitución de aminoácidos. En realizaciones particulares, las sustituciones son conservativas, sustituyendo un aminoácido dentro de la misma clase, como se describe en el presente documento. En realizaciones particulares, el polipéptido es un anticuerpo.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos pueden modificarse para modular la estructura, estabilidad y/o actividad. En dichas realizaciones, las modificaciones pueden ser conservativas o distintas de conservativas. Solo es necesario que las modificaciones sean adecuadas para el experto que lleva a cabo los métodos y que utiliza las composiciones descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones donde el polipéptido es un anticuerpo, las modificaciones reducen pero no eliminan la afinidad de unión a antígeno. En determinadas realizaciones donde el polipéptido es un anticuerpo, las modificaciones aumentan la afinidad de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, las modificaciones potencian la estructura o estabilidad del polipéptido. En determinadas realizaciones, las modificaciones reducen pero no eliminan la estructura o estabilidad del polipéptido. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 20 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 15 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 10 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 9 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 8 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 7 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 6 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 5 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 4 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 3 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 2 o menos inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las variantes modificadas incluyen 1 inserción, supresión o sustitución de aminoácidos.

Además, dentro del alcance se encuentran variantes modificadas postraduccionales. Cualquiera de los polipéptidos proporcionados en el presente documento puede modificarse postraduccionales de cualquier manera reconocida por los expertos en la materia. Las modificaciones postraduccionales habituales de los polipéptidos incluyen enlaces disulfuro intercatenarios, enlaces disulfuro intracatenarios, N-glicosilación y proteólisis. Además se proporcionan en el presente documento otros polipéptidos modificados postraduccionales que tienen modificaciones tales como fosforilación, O-glicosilación, metilación, acetilación, lipidación, anclaje de GPI, miristoilación y prenilación. La modificación postraduccionales puede producirse durante la producción, *in vivo*, *in vitro* o de otro modo. En determinadas realizaciones, la modificación postraduccionales puede ser una modificación intencionada por parte de un experto, por ejemplo, utilizando los métodos proporcionados en el presente documento. En realizaciones particulares, el polipéptido es un anticuerpo.

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

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos que están conjugados con uno o más restos de conjugación. El resto de conjugación puede ser cualquier resto de conjugación que un experto en la materia considere útil. Por ejemplo, el resto de conjugación puede ser un polímero, tal como polietilenglicol, que pueda mejorar la estabilidad del polipéptido *in vitro* o *in vivo*. El resto de conjugación puede tener actividad terapéutica, produciendo así un conjugado de polipéptido-fármaco. El resto de conjugación puede ser una carga útil molecular que sea perjudicial para células diana. El resto de conjugación puede ser un marcador útil para la detección o el diagnóstico. En determinadas realizaciones, el resto de conjugación se une al anticuerpo a través de un enlace covalente directo. En determinadas realizaciones, el resto de conjugación se une al polipéptido a través de un enlazador. En realizaciones ventajosas, el resto de conjugación o el enlazador se acopla a través de uno de los aminoácidos modificados del polipéptido. Se describen en el presente documento restos de conjugación y enlazadores ilustrativos. En realizaciones particulares, el polipéptido es un anticuerpo.

El polipéptido parental puede ser cualquier polipéptido conocido por los expertos en la materia, o descubierto más tarde, sin limitación. En realizaciones particulares, el polipéptido es un anticuerpo. El polipéptido parental puede estar sustancialmente codificado por un gen de polipéptido o genes de polipéptidos de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas, dromedarios, monos, en particular mamíferos y en particular ser humano y en particular ratones y ratas. En una realización, el polipéptido

parental puede ser completamente humano, obtenido, por ejemplo, de un paciente o sujeto, utilizando ratones transgénicos u otros animales (véase Bruggemann y Taussig, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458 para ejemplos de anticuerpos) o bibliotecas de polipéptidos humanos junto con métodos de selección (véase Griffiths y Duncan, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:102-108 para ejemplos de anticuerpos). El polipéptido parental puede ser de cualquier fuente, incluyendo artificial o de origen natural. Por ejemplo, un polipéptido parental puede ser un polipéptido obtenido por ingeniería genética, incluyendo pero sin limitación polipéptidos quiméricos y polipéptidos humanizados (véase Clark, 2000, *Immunol. Today* 21:397-402 para ejemplos de anticuerpos) o procedentes de una biblioteca combinatoria. Además, el anticuerpo parental puede ser una variante obtenida por ingeniería genética de un polipéptido que está sustancialmente codificado por uno o más genes de polipéptidos naturales. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido parental es un polipéptido que se ha identificado mediante maduración de afinidad.

Los anticuerpos parentales pueden ser cualquier polipéptido conocido en la técnica o cualquier polipéptido desarrollado por los expertos en la materia, sin limitación. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación anticuerpo anti-TNF (patente de los Estados Unidos n.º 6.258.562), anticuerpo anti-IL-12 y/o anti-IL-12p40 (patente de los Estados Unidos n.º 6.914.128); anticuerpo anti-IL-18 (publicación de patente de los Estados Unidos n.º 2005/0147610), anti-05, anti-CBL, anti-CD147, anti-gp120, anti-VLA-4, anti-CD11a, anti-CD18, anti-VEGF, anti-CD40L, anti CD-40 (por ejemplo, véase la publicación de PCT N.º WO 2007/124299) anti-id, anti-ICAM-1, anti-CXCL13, anti-CD2, anti-EGFR, anti-TGF-beta 2, anti-HGF, anti-cMet, anti DLL-4, anti-NPR1, anti-PLGF, anti-ErbB3, anti-E-selectina, anti-Fact VII, anti-Her2/neu, anti-F gp, anti-CD11/18, anti-CD14, anti-ICAM-3, anti-ROn, anti-SOST, anti CD-19, anti-CD80 (por ejemplo, véase la publicación de PCT N.º WO 2003/039486, anti-CD4, anti-CD3, anti-CD23, anti-beta2-integrina, anti-alfa4beta7, anti-CD52, anti-HLA DR, anti-CD22 (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos N.º 5.789.554), anti-CD20, anti-MIF, anti-CD64 (FcR), anti-TCR alfa beta, anti-CD2, anti-Hep B, anti-CA 125, anti-EpCAM, anti-gp120, anti-CMV, anti-gp11bIIIa, anti-IgE, anti-CD25, anti-CD33, anti-HLA, anti-IGF1,2, anti-IGFR, anti-VNRIintegrina, anti-IL-1 alfa, anti-IL-1beta, anti-receptor de IL-1, anti-receptor de IL-2, anti-IL-4, anti-receptor de IL-4, anti-IL5, anti-receptor de IL-5, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-receptor de IL-13, anti-IL-17, anti-IL-6R, anti-RANKL, anti-NGF, anti-DKK, anti-alfaVbeta3, anti-IL-17A, anti-IL23p19 y anti-IL-23 (véase Presta, L. G. (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 731-6).

Los polipéptidos parentales también pueden seleccionarse de diversos polipéptidos terapéuticos aprobados para su uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo para uso clínico. Los ejemplos de anticuerpos de dichos polipéptidos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 5.736.137), un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para tratar el linfoma no Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente en desarrollo por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en la patente de los Estados Unidos n.º 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) y PRO70769 (Solicitud de PCT N.º PCT/US2003/040426), trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 5.677.171), un anticuerpo humanizado anti-Her2/neu aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg®), actualmente en desarrollo por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 (patente de los Estados Unidos n.º 4.753.894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (patente de los Estados Unidos N.º 4.943.533; Publicación de PCT N.º WO 96/40210), un anticuerpo quimérico anti-EGFR en ensayos clínicos para diversos cánceres; ABX-EGF (Patente de los Estados Unidos N.º 6.235.883), actualmente en desarrollo por Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (Patente de los Estados Unidos No. 7.247.301), actualmente en desarrollo por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000 y EMD72000 (Merck KGaA) (patente de los Estados Unidos n.º 5.558.864; Murthy, *et al.* (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 252(2): 549-60; Rodeck, *et al.* (1987) *J. Cell. Biochem.* 35(4): 315-20; Kettleborough, *et al.* (1991) *Protein Eng.* 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (publicación de PCT n.º WO 95/20045; Modjtahedi, *et al.* (1993) *J. Cell. Biophys.* 22(1-3): 129-46; Modjtahedi, *et al.* (1993) *Br. J. Cancer* 67(2): 247-53; Modjtahedi, *et al.* (1996) *Br. J. Cancer* 73(2): 228-35; Modjtahedi, *et al.* (2003) *Int. J. Cancer* 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Inmunología Molecular, Cuba) (patente de los Estados Unidos N.º 5.891.996; Estados Unidos Patente de los Estados Unidos N.º 6.506.883; Mateo, *et al.* (1997) *Immunotechnol.* 3(1): 71-81); mAb-806 (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth, *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (publicación de PCT n.º WO 01/62931A2); y SC100 (Scancell) (publicación de PCT n.º WO 01/88138); alemtuzumab (Campath®, Millenium), un mAb humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B; muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), un anticuerpo anti-fusión LFA-3 Fc desarrollado por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por Medimmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade®, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, golimumab (CNTO-148), un anticuerpo de TNF completamente humano desarrollado por Centocor, etanercept (Enbrel®), una fusión de Fc y el receptor de TNF p75 desarrollada por Immunex/Amgen, lenercept, una fusión de Fc y el receptor de TNF p55 desarrollada previamente por Roche, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 en desarrollo por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 en desarrollo por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 en desarrollo por Abgenix, Pentumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUCI en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUCI en desarrollo por Antisoma, AngioMab (AS1405), en desarrollo

por Antisoma, HuBC-1, en desarrollo por Antisoma, Thioplatin (AS 1407), en desarrollo por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 en desarrollo por Biogen, mAb para VLA-1, un anticuerpo anti-integrina VLA-1 en desarrollo por Biogen, un mAb para LTBR, un anticuerpo anti-receptor de linfotaxina beta (LTBR) en desarrollo por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β en desarrollo por Cambridge

5 Antibody Technology, ABT 874 (J695), un anticuerpo anti-IL-12 p40 en desarrollo por Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina 1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B® un anticuerpo anti-Blys en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., mAb para TRAIL-R1, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 en desarrollo por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin®

10 bevacizumab, rhuMab-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF en desarrollo por Genentech, un anticuerpo anti-familia del receptor HER en desarrollo por Genentech, Anti-Factor tisular (ATF), un anticuerpo anti-Factor tisular en desarrollo por Genentech, Xolair® (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE en desarrollo por Genentech, Raptiva® (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a en desarrollo por Genentech y Xoma, Anticuerpo de MLN-02 (anteriormente LDP-02), en desarrollo por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por

15 Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, en desarrollo por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I en desarrollo por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, en desarrollo por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, en desarrollo por Genmab, IDEC-131 y un anticuerpo anti-CD40L en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 en desarrollo por

20 IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD 23 en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) en desarrollo por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico en desarrollo por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR en desarrollo por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 en desarrollo por Imclone, un anticuerpo anti-cadherina VE en desarrollo por Imclone, CEA-Cide® (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (ACE) en desarrollo por Immunomedics, LymphoCide® (Epratuzumab),

25 un anticuerpo anti-CD22 en desarrollo por Immunomedics, AFP-Cide, en desarrollo por Immunomedics, MyelomaCide, en desarrollo por Immunomedics, LkoCide, en desarrollo por Immunomedics, ProstaCide, en desarrollo por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 en desarrollo por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 en desarrollo por Medarex, MDX-070 en desarrollo por Medarex, MDX-018 en desarrollo por Medarex, Osidem® (IDM-1) y anticuerpo anti-Her2 en desarrollo por Medarex e Immuno-Designed Molecules,

30 HuMax®-CD4, un anticuerpo anti-CD4 en desarrollo por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 en desarrollo por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα en desarrollo por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina en desarrollo por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (CD54) en desarrollo por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) en desarrollo por MorphoSys, Nuvion®

35 (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 en desarrollo por Protein Design Labs, HuZAF®, un anticuerpo anti-interferón gamma en desarrollo por Protein Design Labs, Anti-Integrina α5β1, en desarrollo por Protein Design Labs, anti-IL-12, en desarrollo por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM en desarrollo por Xoma, Xolair® (Omalizumab) un anticuerpo anti-IgE humanizado desarrollado por Genentech y Novartis, y MLN01, un anticuerpo anti-integrina Beta2 en desarrollo por Xoma. En otra realización, los productos terapéuticos incluyen KR330 (Kirin); anticuerpo para huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (integrinas alfa V, Centocor); MEDI-

40 522 (integrina alfa Vβ3, Medimmune); volociximab (integrina alfa Vβ1, Biogen/PDL); mAb 216 humano (epítipo glucosilado de linfocitos B, NCI); BiTE MT103 (biespecífico CD19XCD3, Medimmune); 4G7XH22 (biespecífico linfocito BxFcγR1, Medarex/Merck KGa); rM28 (biespecífico CD28XMAPG, n.º de patente de EP EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (biespecífico CD64XEGFR, Medarex); Catumaxomab (removab) (biespecífico EpCAMx anti-CD3, Trion/Fres); Ertumaxomab (biespecífico HER2/CD3, Fresenius Biotech); oregovomab (OvaRex) (CA-125, ViRex); Rencarex® (WX G250) (anhidrasa carbónica IX, Willex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (CD105 (endogлина), Tracon); BMS-663513 (agonista de CD137, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); Siplizumab (MEDI-507) (CD2, Medimmune); Ofatumumab (Humax-CD20) (CD20, Genmab); Rituximab (Rituxan) (CD20, Genentech); veltuzumab (hA20) (CD20, Immunomedics); Epratuzumab (CD22, Amgen); lumiliximab (IDEC

50 152) (CD23, Biogen); muromonab-CD3 (CD3, Ortho); HuM291 (receptor de fc de CD3, PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30, Medarex); MDX-1401 (CD30, Medarex); SGN-30 (CD30, Seattle Genentics); SGN-33 (Lintuzumab) (CD33, Seattle Genentics); Zanolimumab (HuMax-CD4) (CD4, Genmab); HCD122 (CD40, Novartis); SGN-40 (CD40, Seattle Genentics); Campath1h (Alemtuzumab) (CD52, Genzyme); MDX-1411 (CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38, Immunomedics); Galiximab (IDEC-144) (CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (colágeno escindido, Tracon); HuLuc63 (CS1, PDL Pharma); ipilimumab (MDX-010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb); Tremelimumab (Ticilimumab, CP-675,2) (CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (Mapatumumab) (agonista de DR4TRAIL-R1, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5, Amgen); Apomab (DR5, Genentech); CS-1008 (DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (Iexatumumab) (agonista de DR5TRAIL-R2, HGS); Cetuximab (Erbix) (EGFR, Imclone); IMC-11F8, (EGFR, Imclone); Nimotuzumab (EGFR, YM Bio); Panitumumab (Vectabix) (EGFR, Amgen); Zalutumumab (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab); CDX-110 (EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); adecatumumab (MT201) (Epcam, Merck); edrecolomab (Panorex, 17-1A) (Epcam, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (receptor de folato a, Morphotech); KW-2871 (gangliósido GD3, Kyowa); MORAb-009 (GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCgb, Celldex); Trastuzumab (Herceptin) (HER2, Celldex); Pertuzumab (rhuMab 2C4) (HER2 (DI), Genentech); apolizumab (cadena beta de HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R, Amgen); anti-IGF-1R R1507 (IGF1-R, Roche); CP 751871 (IGF1-R, Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R, Imclone); BIIB022 (IGF-1R, Biogen); Mik-beta-1 (IL-2Rb

65 (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (IL6, Centocor); Anti-KIR (1-7F9) (receptor de tipo Ig de linfocitos citolíticos

(KIR), Novo); Hu3S193 (Lewis (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LT $\beta$ R, Biogen); HuHMFG1 (MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (epitopo de carbohidrato ligado a N, Raven); CAL (proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), Universidad de California); CT-011 (PD1, CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1, Medarex/Ono); mAb CT-011 (PD1, Curetech); IMC-3G3 (PDGFR $\alpha$ , Imclone); bavituximab (fosfatidilserina, Peregrine); huJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 ((pan)inhibidor de TGF $\beta$  (IgG4), Genzyme); Infliximab (Remicade) (TNF $\alpha$ , Centocor); A27.15 (receptor de transferrina, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (receptor de transferrina, Salk Institute); Bevacizumab (Avastin) (VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, publicación de PCT n.º WO/2000/034337, Universidad de Texas); IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (VEGFR2, Imclone).

En determinadas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en el presente documento comprenden un aminoácido modificado en una posición específica de sitio. En determinadas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en el presente documento comprenden dos aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios. En determinadas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en el presente documento comprenden tres aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios. En determinadas realizaciones, los polipéptidos proporcionados en el presente documento comprenden más de tres aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitios.

#### *Anticuerpos*

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más polipéptidos que comprenden uno o más aminoácidos modificados según se reivindica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un heterotetrámero que comprende dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera puede unirse a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. Cada cadena pesada puede unirse a la otra cadena pesada mediante uno o más enlaces disulfuro covalentes. Cada cadena pesada y cada cadena ligera también puede tener uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Como conocen los expertos en la materia, cada cadena pesada comprende normalmente un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera comprende normalmente un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante. Como conocen los expertos en la materia, normalmente los anticuerpos tienen afinidad selectiva por sus moléculas diana, es decir, antígenos.

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

El o los aminoácidos modificados se pueden localizar en posiciones específicas de sitios seleccionadas en al menos una cadena polipeptídica de un anticuerpo. La cadena polipeptídica puede ser cualquier cadena polipeptídica del anticuerpo, sin limitación, incluyendo una de las cadenas ligeras o una de las cadenas pesadas. La posición específica de sitio puede estar en cualquier dominio del anticuerpo, incluyendo cualquier dominio variable y cualquier dominio constante.

Las posiciones específicas de sitios para sustitución se pueden describir con cualquier sistema de nomenclatura de polipéptidos conocido por los expertos en la materia. En una realización en donde el polipéptido es un anticuerpo, el sistema de numeración puede ser el sistema de numeración de Kabat, en donde las posiciones específicas de sitios están en los restos de cadena pesada H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 y H438. Específicamente, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 y H438.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005, H023, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421 y H438.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H005, H084, H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359 y H389.

5 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H023, H074, H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, H340 y H438.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H042, H065, H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H356, H358, H360, H383, H384 y H436.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat correspondientes a H292-H301, H303 y H305.

20 En el sistema de numeración de anticuerpos de Chothia, estas posiciones están en los restos de la cadena pesada H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 y H438. Específicamente, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H005, H023, H042, H065, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H138, H139, H155, H160, H162, H165, H172, H174, H176, H177, H191, H194, H219, H238, H239, H241, H243, H246, H262, H264, H265, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H278, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H356, H358, H359, H360, H375, H383, H384, H386, H389, H392, H398, H420, H421, H436 y H438.

35 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H005, H023, H074, H084, H118, H119, H132, H134, H135, H136, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H239, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H293, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H334, H335, H337, H339, H340, H344, H355, H359, H375, H386, H389, H392, H398, H420, H421 y H438.

45 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H005, H084, H118, H132, H136, H239, H293, H334, H355, H359 y H389.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H292-H301, H303 y H305.

50 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H023, H074, H119, H134, H135, H137, H139, H160, H162, H165, H172, H191, H194, H241, H246, H267, H268, H269, H270, H271, H272, H274, H275, H280, H281, H282, H283, H286, H289, H292, H294, H295, H296, H297, H298, H299, H300, H301, H303, H305, H317, H320, H324, H326, H327, H329, H330, H332, H333, H335, H337, H339, H344, H355, H375, H386, H392, H398, H420, H421, H340 y H438.

60 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de Chothia H042, H065, H138, H155, H174, H176, H177, H219, H238, H243, H262, H264, H265, H278, H356, H358, H360, H383, H384 y H436.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L22, L7 y L152, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

65 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más

aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L043, L049, L056, L057, L060, L067, L068, L109, L112, L114, L144, L153, L156, L157, L168, L184, L202, L203 y L206, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L043, L049, L056, L057, L060, L067, L068, L109, L112, L114, L144, L153, L156, L168, L184, L202 y L203, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L043, L049, L056, L057, L060, L067, L068, L109, L144, L153, L156, L184, L202 y L203, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L049, L056, L057, L060, L067, L109, L153, L202 y L203, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L138, L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 y L201, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos menos 1, L003, L005, L007, L008, L009, L010, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L142, L143, L152, L171, L182, L188, L199 y L201, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L003, L005, L007, L008, L009, L016, L017, L018, L020, L022, L026, L027, L045, L058, L063, L065, L066, L070, L077, L079, L107, L142, L152, L171, L182, L188 y L199, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos menos 1, L005, L007, L008, L016, L017, L018, L020, L022, L027, L045, L058, L063, L077, L079, L107, L142, L152, L182, L188 y L199, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia. En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L016, L063 y L199, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L014, L070, L138, L142, L143 y L152, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos (-)L001, L007, L008, L016, L022, L063, L070, L138, L142, L143, L152 y L201, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 22, 7 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 138, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 143, 152, 171, 182, 188, 199 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 20, 22, 26, 27, 45, 58, 63, 65, 66, 70, 77, 79, 107, 142, 152, 171, 182, 188 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 5, 7, 8, 16, 17, 18, 20, 22, 27, 45, 58, 63, 77, 79, 107, 142, 152, 182, 188 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más



aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 16, 63 y 199 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

5 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 14, 70, 138, 142, 143 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

10 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a menos 1, 7, 8, 16, 22, 63, 70, 138, 142, 143, 152 y 201 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 114, 144, 153, 156, 157, 168, 184, 202, 203 y 206 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

20 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 112, 144, 153, 156, 168, 184, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

25 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 43, 49, 56, 57, 60, 67, 68, 109, 144, 153, 156, 184, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

30 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 49, 56, 57, 60, 67, 109, 153, 202 y 203 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

35 En otras palabras, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224 del polipéptido de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1 y en al menos una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 22, 7 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

40 Las posiciones específicas de sitios también se pueden identificar con respecto a las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de referencia. Por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1 se proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de referencia. En la cadena pesada de referencia, las posiciones específicas de sitio están en los restos. 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 423, 424, 439 y 441. Específicamente, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 45 5, 23, 42, 66, 75, 88, 121, 122, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 158, 163, 165, 168, 175, 177, 179, 180, 194, 197, 222, 241, 242, 244, 246, 249, 265, 267, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 281, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 337, 338, 340, 342, 343, 347, 358, 359, 361, 362, 363, 378, 386, 387, 389, 392, 395, 401, 423, 424, 439 y 441 del anticuerpo de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

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

60 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 5, 88, 121, 135, 139, 242, 296, 337, 358, 362 y 392 del anticuerpo de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

65 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 23, 75, 122, 137, 138, 140, 142, 163, 165, 168, 175, 194, 197, 244, 249, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 277, 278, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 306, 308, 320, 323, 327, 329, 330, 332, 333, 335, 336, 338, 340,

342, 343, 347, 358, 378, 389, 395, 401, 423, 424 y 441 del polipéptido de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

5 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 42, 66, 141, 158, 177, 179, 180, 222, 241, 246, 265, 267, 268, 281, 359, 361, 363, 386, 387 y 439 del anticuerpo de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

10 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de las correspondientes a 292-301, 303 y 305 del anticuerpo de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52 y H70, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

20 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190 y H222, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

25 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos modificados en una o más posiciones seleccionadas de los restos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, H241, L22, L7, L152 y H136, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

30 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden una cadena polipeptídica que tiene al menos 70 %, 80 % o 90 % de homología con la SEQ ID NO: 1 y que tiene uno o más aminoácidos modificados en sitios seleccionados de los sitios correspondientes a los restos 404, 121, 180, 241, 136, 25, 40, 119, 190, 222, 19, 52 o 70 del polipéptido de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

35 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden una cadena polipeptídica que tiene al menos 70 %, 80 % o 90 % de homología con la SEQ ID NO: 2 y que tiene uno o más aminoácidos modificados en sitios seleccionados de los sitios correspondientes a los restos 22, 7 y 152 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

40 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios. En determinadas realizaciones, cada aminoácido modificado se encuentra de forma independiente en un sitio específico seleccionado del grupo que consiste en posiciones óptimamente sustituibles de cualquier cadena polipeptídica del anticuerpo.

45 En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios en un único polipéptido de cadena ligera. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios en un único polipéptido de cadena pesada. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden al menos un aminoácido modificado específico de sitio en un polipéptido de cadena ligera y al menos un aminoácido modificado específico de sitio en un polipéptido de cadena pesada.

50 En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden al menos un aminoácido modificado específico de sitio en un polipéptido de cadena ligera y al menos un aminoácido modificado específico de sitio en cada uno de dos polipéptidos de cadena pesada. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden al menos un aminoácido modificado específico de sitio en cada uno de dos polipéptidos de cadena ligera y al menos un aminoácido modificado específico de sitio en un polipéptido de cadena pesada. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden al menos un aminoácido modificado específico de sitio en cada uno de dos polipéptidos de cadena ligera y al menos un aminoácido modificado específico de sitio en cada uno de dos polipéptidos de cadena pesada.

55 En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis o más aminoácidos modificados específicos de sitios. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden de dos a seis aminoácidos modificados.

60 Las posiciones específicas de sitios para sustitución se pueden describir con cualquier sistema de nomenclatura de anticuerpos conocido por los expertos en la materia. En el sistema de numeración de Kabat, estas posiciones están en los restos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 y H221. En otras palabras, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 y H221.

65

En algunas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos de Kabat H404, H121, H180, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 y H221.

5 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados en al menos una o más posiciones seleccionadas de los restos L22, L7 y L152, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

10 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios en posiciones de secuencia correspondientes a los restos seleccionados de los restos de cadena pesada o cadena ligera H404, H121, H180, L22, L7, L152, H136, H25, H40, H119, H190, H222, H19, H52, H70, H110 y H221, según el esquema de numeración de Kabat o Chothia.

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios en posiciones de secuencia correspondientes a los restos seleccionados de los restos 407, 124, 183, 139, 25, 40, 119, 193, 225, 19, 52, 71, 117 o 224 del polipéptido de cadena pesada representativo según la SEQ ID NO: 1.

20 En determinadas realizaciones, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que comprenden dos o más aminoácidos modificados específicos de sitios en posiciones de secuencia correspondientes a los restos seleccionados de los restos 22, 7 o 152 del polipéptido de cadena ligera representativo según la SEQ ID NO: 2.

25 El anticuerpo puede tener cualquier forma de anticuerpo reconocida por los expertos en la materia. El anticuerpo puede comprender una única cadena polipeptídica, una única cadena pesada o una única cadena ligera. El anticuerpo también puede formar multímeros que serán reconocidos por los expertos en la materia, incluyendo homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros. Estos multímeros pueden estar unidos o no. Los enlaces útiles incluyen enlaces disulfuro intercatenarios habituales para moléculas polipeptídicas. Los multímeros también pueden estar unidos por otros aminoácidos, incluyendo los aminoácidos modificados descritos en el presente documento. El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina tal como de cualquier clase o subclase incluyendo IgA, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. El anticuerpo puede estar en forma de cualquier fragmento de anticuerpo incluyendo Fv, Fc, Fab y (Fab')<sub>2</sub> y scFv.

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

65 Los antígenos adicionales incluyen, pero sin limitación, activadores de la transcripción y de la expresión. Los activadores de la transcripción y de la expresión ilustrativos incluyen genes y proteínas que modulan el crecimiento celular, la diferenciación, la regulación, o similares. Se encuentran activadores de la expresión y de la transcripción en procariontes, virus y eucariotas, incluyendo hongos, plantas y animales, incluyendo mamíferos, lo que proporciona una amplia gama de dianas terapéuticas. Se apreciará que los activadores de la expresión y de la transcripción

regulan la transcripción mediante muchos mecanismos, por ejemplo, uniéndose a receptores, estimulando una cascada de transducción de señales, regulando la expresión de factores de transcripción, uniéndose a promotores y potenciadores, uniéndose a proteínas que se unen a promotores y potenciadores, desenrollando ADN, cortando y empalmado pre-ARNm, poliadenilando ARN y degradando ARN. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, 5 activadores de la expresión tales como citocinas, moléculas inflamatorias, factores de crecimiento, sus receptores y producto de oncogenes, por ejemplo, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-8, etc.), interferones, FGF, IGF-I, IGF-II, FGF, PDGF, TNF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, KGF, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4/VCAM-1, ICAM-1/IFA-1 y hialurina/CD44; moléculas de transducción de señales y productos oncogénicos correspondientes, por ejemplo, Mos, Ras, Raf y Met; y activadores y supresores de la transcripción, por ejemplo, p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, y 10 receptores de hormonas esteroideas tales como los de estrógeno, progesterona, testosterona, aldosterona, el ligando del receptor de LDL y corticosterona.

Las proteínas de vacuna pueden ser antígenos, incluyendo, pero sin limitación, proteínas de hongos infecciosos, por ejemplo, *Aspergillus*, especies de *Candida*; bacterias, en particular *E. coli*, que presenta un modelo para bacterias 15 patógenas, así como bacterias médicamente importantes tales como estafilococos (por ejemplo, *aureus*) o estreptococos (por ejemplo, *pneumoniae*); protozoos tales como esporozoos (por ejemplo, plasmodios), rizópodos (por ejemplo, *Entamoeba*) y flagelados (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Giardia*, etc.); virus tales como virus de ARN (+) (los ejemplos incluyen Poxvirus, por ejemplo, vaccinia; Picornavirus, por ejemplo, polio; Togavirus, por ejemplo, rubéola; Flavivirus, por ejemplo, VHC; y Coronavirus), virus de ARN (-) (por ejemplo, Rabdovirus, por 20 ejemplo, VSV; Paramixovirus, por ejemplo, VSR; Ortomixovirus, por ejemplo, gripe; Bunyavirus; y Arenavirus), virus de ADNbc (Reovirus, por ejemplo), virus de ARN a ADN, es decir, retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV, y determinados virus de ADN a ARN tales como hepatitis B.

Los antígenos pueden ser enzimas, incluyendo, pero sin limitación, amidasas, racemasas de aminoácidos, acilasas, 25 deshalogenasas, dioxigenasas, diarilpropano peroxidases, epimerasas, epóxido hidrolasas, esterases, isomerasas, quinasas, glucosa isomerasas, glucosidasas, glucosil transferasas, haloperoxidasas, monooxigenasas (por ejemplo, p450s), lipasas, lignina peroxidases, nitrilo hidratasas, nitrilasas, proteasas, fosfatases, subtilisinas, transaminasa y nucleasas.

Las proteínas relacionadas con la agricultura, tales como proteínas de resistencia a insectos (por ejemplo, las 30 proteínas Cry), enzimas de producción de almidón y lípidos, toxinas vegetales y de insectos, proteínas de resistencia a toxinas, proteínas de desintoxicación de micotoxinas, enzimas de crecimiento de plantas (por ejemplo, Ribulosa 1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa, "RUBISCO"), lipoxigenasa (LOX) y fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa también pueden ser antígenos.

Por ejemplo, el antígeno puede ser una molécula asociada a la enfermedad, tal como un antígeno de superficie 35 tumoral, tal como idiotipos de linfocitos B, CD20 en linfocitos B malignos, CD33 en blastos leucémicos y HER2/neu en cáncer de mama. Como alternativa, el antígeno puede ser un receptor del factor de crecimiento. Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento epidérmico (EGF), transferrina, factor 40 insulínico de crecimiento, factores de crecimiento transformantes (TGF), interleucina 1 e interleucina 2. Por ejemplo, se ha encontrado una alta expresión de receptores de EGF en una amplia diversidad de tumores primarios epiteliales humanos. Se ha encontrado que TGF- $\alpha$  media en una ruta de estimulación autocrina en células cancerosas. Se ha demostrado que varios anticuerpos monoclonales murinos tienen la capacidad de unirse a 45 receptores de EGF, bloquear la unión del ligando a los receptores de EGF e inhibir la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer humano en cultivo y en modelos de xenoinjerto. Mendelsohn y Baselga (1995) Antibodies to growth factors and receptors, en Biologic Therapy of Cancer, 2ª Ed., J B Lippincott, Filadelfia, págs. 607-623. Por tanto, los anticuerpos se pueden usar para tratar diversos cánceres.

El antígeno también puede ser proteína de superficie celular o receptor asociado a arteriopatía coronaria, tal como 50 receptor de glucoproteína IIb/IIIa plaquetaria, enfermedades autoinmunitarias tales como CD4, CAMPATH-1 y región de lípido A del lipopolisacárido bacteriano gramnegativo. Se han analizado anticuerpos humanizados contra CD4 en ensayos clínicos en el tratamiento de pacientes con micosis fungoide, psoriasis pustular generalizada, psoriasis grave y artritis reumatoide. Se han analizado clínicamente anticuerpos contra la región de lípido A del lipopolisacárido bacteriano gramnegativo en el tratamiento del choque séptico. Se han analizado clínicamente 55 anticuerpos contra CAMPATH-1 también en el tratamiento de la artritis reumatoide refractaria. Por tanto, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden usar para tratar diversas enfermedades autoinmunitarias.

Los antígenos útiles también incluyen proteínas o péptidos asociados a enfermedades alérgicas humanas, tales 60 como proteínas mediadoras inflamatorias, por ejemplo, interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), receptor de leucotrienos y 5-lipoxigenasa, y moléculas de adhesión tales como V-CAM/VLA-4. Además, IgE también puede actuar como el antígeno debido a que la IgE desempeña un papel fundamental en las reacciones alérgicas de hipersensibilidad inmediata de tipo I, tales como el asma. Los estudios han mostrado que el nivel de IgE en suero total tiende a correlacionarse con la gravedad de las enfermedades, especialmente en el asma. Burrows *et al.* (1989) 65 "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens" New Engl. L. Med. 320:271-277. Por tanto, pueden usarse anticuerpos seleccionados contra IgE para reducir el nivel de IgE o bloquear la unión de la

IgE a mastocitos y basófilos en el tratamiento de enfermedades alérgicas sin tener influencia sustancial en las funciones inmunitarias normales.

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

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

30 El antígeno puede ser una molécula CD, incluyendo, pero sin limitación, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79 $\alpha$ , CD79 $\beta$ , CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD110-113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, CD129, CDw130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 y TCR $\zeta$ . El antígeno puede ser VEGF, receptor de VEGF, EGFR, Her2, TNFa, receptor de TNFR1, GPIIb/IIIa, cadena alfa de IL-2R, cadena beta de IL-2R, proteína F del VRS, integrina alfa 4, IgE, receptor de IgE, digoxina, veneno de *Echis*, complemento C5, OPGL, antígeno tumoral CA-125, proteínas de estafilococos, proteínas de *Staphylococcus epidermidis*, proteínas de *Staphylococcus aureus*, proteínas implicadas en la infección estafilocócica (incluyendo, pero sin limitación, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), receptor de IL-6, CTLA-4, VRS, subunidad Tac del receptor de IL-2, IL-5 y EpCam. El antígeno puede ser un fragmento de una molécula.

55 Los ejemplos de anticuerpos parentales biespecíficos útiles incluyen, pero sin limitación, los que tienen un anticuerpo dirigido contra un antígeno de células tumorales y el otro anticuerpo dirigido contra una molécula desencadenante citotóxica tal como anti-Fc $\gamma$ RI/anti-CD 15, anti-p185<sup>HER2</sup>/Fc $\gamma$ RIII (CD16), anti-CD3/anti-linfocitos B malignos (1D10), anti-CD3/anti-p 185<sup>HER2</sup>, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/l-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de la hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión de células neurales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a pancarcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; anticuerpos biespecíficos con un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno tumoral y otro anticuerpo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-lD-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-ACE/anti-cadena A de la ricina, anti-interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )/anti-idiotipo de hibridoma, anti-ACE/anti-alcaloide de la vinca; anticuerpos biespecíficos para la conversión de profármacos activados por enzimas, tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco de fosfato de mitomicina a alcohol de mitomicina); anticuerpos biespecíficos que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA); anticuerpos biespecíficos para dirigir complejos inmunitarios a receptores de la

superficie celular tales como anti-receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL)/anti-Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); anticuerpos biespecíficos para su uso en terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (VHS), anti-complejo de receptor de linfocitos T:CD3/anti-virus de la gripe, anti-FcγR/anti-VIH; anticuerpos biespecíficos para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo*, tales como anti-ACE/anti-EOTUBE, anti-ACE/anti-DPTA, anti-anti-p185<sup>HER2</sup>/anti-hapteno; anticuerpos biespecíficos como adyuvantes de vacunas (véase Fanger, M W *et al.*, Crit Rev Immunol. 1992; 12(34): 101-24.); y anticuerpos biespecíficos como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-ACE/anti-β-galactosidasa (véase Nolan, O *et R.* O'Kennedy, Biochim Biophys Acta. 1 de agosto de 1990; 1040(1):1-11). Los ejemplos de anticuerpos trispecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

#### Enlazadores y cargas útiles

En determinadas realizaciones, el polipéptido comprende un aminoácido modificado que tiene un grupo reactivo, como se reivindica en el presente documento. Un experto en la materia puede usar el grupo reactivo para unir el anticuerpo a cualquier entidad molecular capaz de formar un enlace covalente con el aminoácido modificado, directa o indirectamente a través de un enlazador. Por tanto, se proporcionan en el presente documento conjugados que comprenden un polipéptido que comprende un resto de aminoácido correspondiente a un compuesto de fórmula II o 30 unido a una carga útil y que comprende opcionalmente un resto de enlace entre el polipéptido y la carga útil.

Los enlazadores útiles incluyen los descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el enlazador es cualquier enlazador divalente o multivalente conocido por los expertos en la materia. En general, el enlazador es capaz de formar enlaces covalentes con el resto funcional y el carbono alfa del aminoácido modificado. Los enlazadores divalentes útiles incluyen un enlace, alquileo, alquileo sustituido, heteroalquileo, heteroalquileo sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno y heteroarileno sustituido. En determinadas realizaciones, el enlazador es alquileo C<sub>1-10</sub> o heteroalquileo C<sub>1-10</sub>.

La carga útil molecular puede ser cualquier entidad molecular que un experto en la materia podría desear conjugar con el polipéptido. En determinadas realizaciones, la carga útil es un resto terapéutico. En dicha realización, el conjugado polipeptídico se puede usar para dirigir el resto terapéutico a su diana molecular. En determinadas realizaciones, la carga útil es un resto de marcaje. En dichas realizaciones, el conjugado polipeptídico se puede usar para detectar la unión del polipéptido a su diana. En determinadas realizaciones, la carga útil es un resto citotóxico. En dichas realizaciones, el conjugado se puede usar para dirigir el resto citotóxico a una célula enferma, por ejemplo, una célula cancerosa, para iniciar la destrucción o eliminación de la célula. Están dentro del alcance de los conjugados descritos en el presente documento conjugados que comprenden otras cargas útiles moleculares evidentes para los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, un conjugado puede tener una carga útil seleccionada del grupo que consiste en un marcador, un colorante, un polímero, un polímero hidrosoluble, polietilenglicol, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulante, un compuesto citotóxico, un radionúclido, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo polipeptídico, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante metálico, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un péptido, un dendrímero hidrosoluble, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, un resto que contiene metal, un resto radioactivo, un grupo funcional nuevo, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, un resto fotoconfinado, un resto fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, un resto que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar ligado a carbono, un agente rédox activo, un aminotioácido, un resto tóxico, un resto marcado con isótopos, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrón denso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la carga útil es un marcador, un colorante, un polímero, un compuesto citotóxico, un radionúclido, un fármaco, un marcador de afinidad, una resina, una proteína, un polipéptido, un análogo de polipéptido, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, un quelante metálico, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un péptido, un fluoróforo o un azúcar ligado a carbono. En otra realización, la carga útil es un marcador, un colorante, un polímero, un fármaco, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, un ADN, un ARN o un péptido.

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

Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfano, butionina sulfoximina, calicheamicina, derivados de calicheamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbacina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, decarbacina, DM1, DM4, docetaxel, doxorubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiaurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbicina, rizoxina, estreptoizotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

antagonistas de los receptores de leucotrieno.

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

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

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

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

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

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



mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamnirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuacuona; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (exento de Cremophor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel modificadas técnicamente con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) y TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptapurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

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

En determinadas realizaciones, la carga útil es uno o más polímeros hidrosolubles. Una amplia diversidad de

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

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

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

El polímero hidrosoluble puede tener cualquier forma estructural incluyendo, pero sin limitación, lineal, bifurcado o ramificado. Normalmente, el polímero hidrosoluble es un poli(alquilenglicol), tal como poli(etilenglicol) (PEG), pero también se pueden emplear otros polímeros hidrosolubles. A modo de ejemplo, se utiliza PEG para describir determinadas realizaciones.

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

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

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

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

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

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

En determinadas realizaciones, la carga útil es un polímero que contiene azida o acetileno que comprende una cadena principal polimérica hidrosoluble que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800 kDa a aproximadamente 100.000 kDa. La cadena principal polimérica del polímero hidrosoluble puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, debe entenderse que una amplia diversidad de polímeros hidrosolubles incluyendo, pero sin limitación, poli(etilen)glicol y otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso y que se pretende que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) abarque e incluya todas las moléculas de este tipo. El término PEG incluye, pero sin limitación, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG de múltiples ramas, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes en la cadena principal polimérica) o PEG con enlaces degradables en él.

La cadena principal polimérica puede ser lineal o ramificada. Las cadenas principales poliméricas se conocen en general en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo de rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de rama central. Se usa habitualmente PEG en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de rama central también se puede obtener de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como R-(PEG-OH)<sub>m</sub>, en que R procede de un resto de núcleo, tal como glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol, y m representan el número de ramas. Las moléculas de PEG de múltiples ramas, tales como las descritas en las patentes de los Estados Unidos N.º 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos 2003/0143596; documento WO 96/21469; y documento WO 93/21259 también se pueden usar como la cadena principal polimérica.

El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por PEG(-YCHZ<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde Y es un grupo de enlace y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

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

Además de estas formas de PEG, el polímero también se puede preparar con enlaces débiles o degradables en la cadena principal. Por ejemplo, se puede preparar PEG con enlaces éster, en la cadena principal polimérica, que están sujetos a hidrólisis. Como se muestra en el presente documento, esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular: -PEG-CO<sub>2</sub>-PEG- +H<sub>2</sub>O→PEG-CO<sub>2</sub>H+HO-PEG-. Los expertos en la materia entienden que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, las divulgadas en el presente documento.

Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso. En algunas realizaciones, son particularmente cadenas principales poliméricas que son hidrosolubles, con de 2 a aproximadamente 300 extremos. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de los mismos (incluyendo, pero sin limitación, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica puede variar, normalmente está en el intervalo de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da, con frecuencia de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

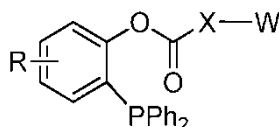
Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior sustancialmente para cadenas principales hidrosolubles no es de ningún modo exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas en el presente documento se contemplan como adecuados para su uso.

En algunas realizaciones, los derivados poliméricos son "multifuncionales", lo que significa que la cadena principal

polimérica tiene al menos dos extremos y posiblemente hasta aproximadamente 300 extremos, funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados de polímero multifuncionales incluyen, pero sin limitación, polímeros lineales que tienen dos extremos, estando cada extremo enlazado a un grupo funcional que puede ser igual o distinto.

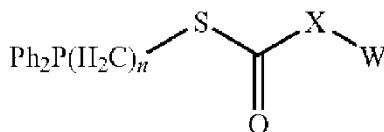
5 El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un resto de carga útil que contiene un éster de arilo y funcionalizarse de manera apropiada con un resto de aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona después de forma eficaz con un enlace éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). En algunas realizaciones, el aminoácido que contiene azida es una alquil azida (incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una aril azida (p-azido-fenilalanina).

Los restos de carga útil a modo de ejemplo que contienen un aril éster y un resto fosfina pueden representarse de la siguiente manera:



en donde X es -O-, -NH-, -S-, o un enlace sencillo, Ph es fenilo, W es un resto de carga útil y R es H, alquilo, arilo, alquilo sustituido y grupos arilo sustituidos. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, -CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R", -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -CN y -NO<sub>2</sub>. Cada uno de R', R", R''' y R'''' es independientemente hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, incluyendo, pero sin limitación, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, alcoxi o grupos tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto descrito en el presente documento incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo hacen cada uno de los grupos R', R", R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la materia comprenderá que se entiende que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos que no son grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (incluyendo, pero sin limitación, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (incluyendo, pero sin limitación, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y similares).

El grupo funcional azida también puede hacerse reaccionar selectivamente con un resto de carga útil que contenga un tioéster y funcionalizarse adecuadamente con un resto aril fosfina para generar un grupo enlazador de amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante reacciona de forma eficaz con el enlace tioéster para generar la amida correspondiente. Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo que contienen un tioéster y un resto fosfina pueden representarse de la siguiente manera:



40 en donde n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo y W es un resto de carga útil.

En una realización, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-PAY-B-alquínilo, en la que: B es un resto de enlace, que puede estar presente o ausente; PAY es un resto de carga útil; A es un resto de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual a B o distinto; y X es un segundo grupo funcional. Los ejemplos de un resto de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo funcionalizado de forma múltiple que contiene hasta 18, y más preferentemente, entre 1-10 átomos de carbono. Se puede incluir en la cadena de alquilo un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y más preferentemente 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o átomos de azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen los grupos de enlace descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior para restos de unión no es por ningún medio exhaustiva y es meramente ilustrativa, y que se considera que todos los restos de unión que tengan las cualidades descritas en el presente documento son adecuados para su uso.

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

El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo o resto protector que impide la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector puede seleccionarse entre el grupo de *tert*-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como 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. También pueden usarse otros grupos protectores conocidos en la técnica.

Los ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la bibliografía incluyen, pero sin limitación, carbonato de N-succinimidilo (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.281.698, 5.468.478), amina (véase, por ejemplo, Buckmann *et al.* Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplisky *et al.* Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (véase, por ejemplo, Andresz *et al.* Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson *et al.* en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pág. 170-181, Harris & Zaplisky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también la patente de Estados Unidos N.º 5.672.662), succinato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Abuchowski *et al.* Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich *et al.* Macromol. Chem. 180:1381 (1979), éster de succinimidilo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5,650,234), éter de glicidilo (véase, por ejemplo, Pitha *et al.* Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling *et al.*, Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, por ejemplo, Beauchamp, *et al.*, Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli *et al.* J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, por ejemplo, Veronese, *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, por ejemplo, Harris *et al.* J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), la Patente de Estados Unidos n.º 5.824.784, la Patente de Estados Unidos N.º 5.252.714), maleimida (véase, por ejemplo, Goodson *et al.* Bio/Technology 8:343 (1990), Romani *et al.* en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridil-disulfuro (véase, por ejemplo, Woghiren, *et al.* Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney *et al.*, Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.900.461).

En determinadas realizaciones, los derivados de polímero comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura: X-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-alquinilo, en la que: X es un grupo funcional como se describe en el presente documento; y n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000. En otra realización, los derivados de polímero comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura: X-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-W-alquinilo, en la que: W es un resto enlazador alifático o aromático que comprende entre 1-10 átomos de carbono; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; X es un grupo funcional como se describe en el presente documento; y m está entre 1 y 10. Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alqueno, grupos amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina y vinilpiridina, y cetona.

Los derivados de PEG que contienen alquinilo pueden prepararse por diversos métodos conocidos en la técnica y/o desvelados en el presente documento. En un método para la preparación de un derivado de polímero que contiene alquinilo, un agente enlazador que porta una funcionalidad alquinilo está en contacto con un resto de carga útil, en donde el agente de unión porta una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero de PEG, para formar un producto derivado de polímero que contiene alquinilo, en donde el alquinilo se separa de la estructura principal del polímero por un grupo de unión.

En el presente documento se muestra un esquema de reacción ejemplar: X-PEG-M+N-enlazador-alquinilo→PG-X-PEG-enlazador-alquinilo, en el que: PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo de terminación, tal como alcoxi o un grupo funcional como se describe en el presente documento; y M es un grupo funcional que no es reactivo con la funcionalidad alquinilo pero que reaccionará de forma eficaz y selectiva con el grupo funcional N. Los ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, siendo M un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; siendo M una cetona si N es una hidrazida o un resto aminooxi; siendo M un grupo saliente si N es un nucleófilo.

La purificación del producto en bruto puede lograrse por métodos conocidos que incluyen, pero sin limitación, precipitación del producto, seguido de cromatografía, si es necesario.

5 Un ejemplo más específico se muestra en el presente documento en el caso de PEG diamina, en que una de las aminas está protegida por un resto de grupo protector tal como *tert*-butil-Boc, y la PEG diamina mono protegida resultante se hace reaccionar con un resto de unión que porta la funcionalidad alquinilo: BocHN-PEG-NH<sub>2</sub>+HO<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-alquinilo. En este caso, el grupo amina puede acoplarse al grupo de ácido carboxílico utilizando diversos agentes activadores tales como cloruro de tionilo o reactivos de carbodiimida, y N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace amida entre el derivado de PEG monoamina y el resto enlazador que porta alquinilo. Después de la formación satisfactoria del enlace de amida, el derivado resultante que contiene alquinilo protegido con *N-tert*-butil-Boc puede usarse directamente para modificar moléculas bioactivas o puede elaborarse adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo *N-t*-Boc puede hidrolizarse por tratamiento con un ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante puede usarse como un asa sintética para instalar otra funcionalidad útil, tal como grupos de maleimida, disulfuros activados, ésteres activados, etc., para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

20 En otra realización, el derivado de polímero tiene la estructura: X-A-PAY-B-C≡C-R, en la que: R puede ser H o un alquilo, alqueno, alquioxo, o un grupo arilo o arilo sustituido; B es un resto de enlace, que puede estar presente o ausente; PAY es un resto de carga útil; A es un resto de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual a B o distinto; y X es un segundo grupo funcional.

25 Los ejemplos de un resto de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo alquilo funcionalizado de forma múltiple que contiene hasta 18, y más preferentemente, entre 1-10 átomos de carbono. Un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre puede incluirse con la cadena de alquilo. La cadena de alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de un resto de enlace para A y B incluyen, pero sin limitación, un grupo arilo funcionalizado de forma múltiple, que contiene hasta 10 y más preferentemente 5-6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o átomos de azufre. Otros ejemplos de grupos enlazadores adecuados incluyen los grupos de unión descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.932.462 y 5.643.575, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos WO 2003/0143596. Aquellos con una habilidad habitual en la técnica reconocerán que la lista anterior para restos de unión no es por ningún medio exhaustiva y está destinada a ser meramente ilustrativa, y que se considera que una gran diversidad de restos de unión que tienen las cualidades descritas en el presente documento son útiles.

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

45 En otra realización, los derivados de polímero comprenden una estructura principal polimérica que tiene la estructura: X-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C≡CH, en la que: X es un grupo funcional como se describe en el presente documento; n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y m está entre 1 y 10. En el presente documento se muestran ejemplos específicos de cada uno de los polímeros heterobifuncionales de PEG.

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

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

65 Los ejemplos de Nu incluyen, pero sin limitación, grupos amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminooxi que reaccionarían principalmente mediante un mecanismo de tipo SN<sub>2</sub>. Los ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen los grupos funcionales que reaccionarían principalmente a través de una reacción de adición

nucleófila. Los ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato, y otros grupos que se espera que experimenten desplazamiento nucleófilo, así como cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

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

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

15 Los polímeros solubles en agua pueden unirse a los polipéptidos. Los polímeros solubles en agua pueden unirse mediante un aminoácido no codificado de forma natural incorporado en los polipéptidos o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido no codificado de forma natural o codificado de forma natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido no codificado de forma natural o codificado de forma natural. En una realización, el aminoácido no codificado de forma natural es un aminoácido modificado como se describe en el presente documento. Como alternativa, los polímeros solubles en agua se unen a un anticuerpo de unión a antígeno que incorpora un aminoácido no codificado de forma natural mediante un aminoácido de origen natural (incluyendo, pero sin limitación, cisteína, lisina o el grupo amina del resto N-terminal). En algunos casos, los polipéptidos comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos modificados, en los que uno o más aminoácidos no codificados de forma natural están unidos a uno o más polímeros solubles en agua (incluyendo, pero sin limitación, PEG y/u oligosacáridos). En algunos casos, los polipéptidos comprenden además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos codificados de forma natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunos casos, los polipéptidos comprenden uno o más aminoácidos no codificados de forma natural unidos a polímeros solubles en agua y uno o más aminoácidos de origen natural unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua potencian la semivida en suero de los polipéptidos con respecto a la forma no conjugada.

30 El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido (es decir, el grado de PEGilación o glucosilación) puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica (incluyendo, pero sin limitación, aumentada o disminuida), tal como semivida *in vivo*. En algunas realizaciones, se aumenta la semivida de un polipéptido al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces con respecto a un polipéptido no modificado.

35 En una realización, un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal que está unido directamente a la estructura principal del PEG.

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

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

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

55 En otra realización, un polipéptido que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal que está unido a la estructura principal del PEG mediante un enlace de amida.

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

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

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

etc.), m es 2-10 y n es 100 -1.000.

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

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

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

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

El grado y los sitios en los cuales el polímero o polímeros solubles en agua están unidos a los polipéptidos pueden modular la unión de los polipéptidos a un antígeno o receptor.

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

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

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

La PEGilación (es decir, la adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos que contienen un aminoácido no codificado de forma natural, tal como una p-azido-L-fenilalanina, se lleva a cabo mediante cualquier método conveniente. Por ejemplo, un polipéptido se PEGila con un derivado de mPEG terminado en alquino. En resumen, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH sólido, con agitación, a una solución acuosa de polipéptido que contiene p-azido-L-Phe a temperatura ambiente. Normalmente, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene un pK<sub>a</sub> cerca del pH al cual se va a llevar a cabo la reacción (generalmente, aproximadamente pH 4-10). Los ejemplos de tampones adecuados para la PEGilación a pH 7,5, por ejemplo, incluyen, pero sin limitación, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS y TES. El pH se controla y ajusta continuamente si es necesario. La reacción normalmente se deja continuar durante aproximadamente 1-48 horas.

Posteriormente, los productos de reacción se someten a cromatografía por interacción hidrófoba para separar las variantes de polipéptido PEGiladas del mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH libre y cualquier complejo de alto peso molecular del polipéptido pegilado que puede formarse cuando se activa PEG no bloqueado en ambos extremos de la molécula, reticulando de este modo las moléculas de polipéptido variantes. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrófoba son tales que mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH libre fluye a través de la columna, mientras que cualquiera de los complejos variantes de polipéptido PEGilado reticulado eluye después de las formas deseadas, que contienen una molécula variante de polipéptido conjugada a uno o más grupos de PEG. Las condiciones adecuadas varían dependiendo de los tamaños relativos de los complejos reticulados frente a los conjugados deseados y los expertos en la materia las determinan fácilmente. El eluyente que contiene los conjugados deseados se concentra por ultrafiltración y se desala por diafiltración.



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

15 Un polímero soluble en agua unido a un aminoácido de un polipéptido puede derivatizarse o sustituirse adicionalmente sin limitación.

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

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

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

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

En otra realización, un polipéptido se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de alquino que reaccionará con un resto de azida presente en la cadena lateral del aminoácido no codificado de forma natural, tal como un aminoácido modificado descrito en el presente documento.

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

En otra realización, un polipéptido que comprende un aminoácido no codificado de forma natural que contiene un alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene un resto de azida terminal o alquino terminal que está unido a la estructura principal de PEG por medio de un engarce de amida.

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

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

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

Otras moléculas de PEG a modo de ejemplo que pueden estar unidas a polipéptidos, así como los métodos de PEGilación, incluyen los descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 5 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0027217; 2001/0021763; las patentes de Estados Unidos n.º 6.646.110; 5.824.778; 5.476.653; 5.219.564; 5.629.384; 5.736.625; 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.473.034; 5.516.673; 5.382.657; 6.552.167; 6.610.281; 6.515.100; 6.461.603; 6.436.386; 6.214.966; 5.990.237; 5.900.461; 5.739.208; 5.672.662; 5.446.090; 5.808.096; 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339; 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 10 5.559.213; 5.612.460; 5.747.646; 5.834.594; 5.849.860; 5.980.948; 6.004.573; 6.129.912; WO 97/32607, EP 229.108, EP 402.378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, 15 EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en el presente documento puede usarse en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, monocatenaria, de cadena ramificada, de cadena de múltiples brazos, funcional individual, bifuncional, multifuncional, o y cualquier combinación de las mismas.

20 En determinadas realizaciones, los polipéptidos pueden unirse a las cargas útiles con uno o más enlazadores que tengan la capacidad de reaccionar con el aminoácido modificado. El uno o más enlazadores pueden ser cualquiera de los enlazadores evidentes para los expertos en la materia. El término "enlazador" se usa en el presente documento para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y normalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son 25 sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles, incluyendo, pero sin limitación, en condiciones fisiológicas durante un período prolongado de tiempo, tal vez incluso de forma indefinida. Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, sangre. Enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace puede degradarse mediante una o más enzimas. Como se entiende en la técnica, El PEG y los polímeros 30 relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura principal del polímero o en el grupo enlazador entre la estructura principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados por la reacción de los ácidos carboxílicos del PEG o los ácidos carboxílicos del PEG activados con grupos alcohólicos en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, pero sin 35 limitación, enlaces carbonato; enlaces imina que son el resultado de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de la reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ostoéster que son el producto de la reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, incluyendo, pero sin limitación, en un extremo de un polímero tal como PEG y un 40 grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamida, incluyendo, pero sin limitación, en el extremo de un polímero y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido. En los polipéptidos pueden usarse enlazadores ramificados. Los expertos en la materia conocen varios enlazadores escindibles distintos. Véanse las patentes de Estados Unidos N.º 4.618.492; 4.542.225 y 4.625.014. Los mecanismos para la liberación de un agente de estos grupos enlazadores incluyen, por ejemplo, la irradiación de un enlace fotolábil y la hidrólisis catalizada por ácido. La Patente de Estados Unidos n.º 4.671.958, por ejemplo, incluye una descripción de 45 inmunoconjugados que comprenden enlazadores que se escinden en el sitio diana *in vivo* mediante enzimas proteolíticas del sistema del complemento del paciente. La longitud del enlazador se puede predeterminar o seleccionar dependiendo de una relación espacial deseada entre el polipéptido y la molécula unida a él. En vista del gran número de métodos que se han informado para acoplar diversos compuestos para radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos, toxinas y otros agentes a los polipéptidos, un experto en la materia podrá 50 determinar un método adecuado para acoplar un agente dado a un polipéptido.

Para unir los conjugados se puede usar cualquier enlazador hetero u homobifuncional. El enlazador puede tener un 55 amplio intervalo de pesos moleculares o de longitudes moleculares. Se pueden usar enlazadores de peso molecular más grande o más pequeño para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre el polipéptido y la entidad enlazada. Los enlazadores que tienen una longitud molecular más larga o más corta también se pueden usar para proporcionar un espacio o flexibilidad deseados entre el polipéptido y la entidad enlazada. De forma análoga, puede utilizarse un enlazador que tenga una forma o conformación particular para impartir una forma o 60 conformación particular al polipéptido o la entidad enlazada, ya sea antes o después de que el polipéptido alcance su diana. Para modular la liberación de un polipéptido o una carga útil en las condiciones deseadas pueden seleccionarse los grupos funcionales presentes en cada extremo del enlazador. Esta optimización de la relación espacial entre el polipéptido y la entidad enlazada puede proporcionar propiedades nuevas, moduladas o deseadas a la molécula.

65 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan enlazadores bifuncionales solubles en agua que tiene de estructura de "mancuerna" que incluyen: a) una azida, un alquino, una hidrazina, una hidrazida, una

- hidroxilamina o una fracción que contiene carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura principal del polímero; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la estructura principal del polímero. El segundo grupo funcional puede ser igual o distinto al primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional. En algunas realizaciones, se proporcionan compuestos solubles en agua que comprenden al menos un brazo de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser una estructura dendrítica.

#### *Composiciones de polipéptidos*

- Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones utilizando métodos disponibles en la técnica y los desvelados en el presente documento. Cualquiera de los compuestos desvelados en el presente documento puede proporcionarse en la composición farmacéutica apropiada y administrarse por una vía de administración adecuada.
- En determinados casos, las composiciones de polipéptidos proporcionadas en el presente documento comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser un diluyente, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en E.W. Martin, 1990, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.
- En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para la administración a un sujeto humano. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica contendrá una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del polipéptido junto con una cantidad adecuada de vehículo, para proporcionar la forma de administración apropiada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.
- En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona en una forma adecuada para administración intravenosa. Normalmente, las composiciones adecuadas para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Dichas composiciones, sin embargo, pueden administrarse por una vía distinta de la administración intravenosa.
- En casos particulares, la composición farmacéutica es adecuada para administración subcutánea. En casos particulares, la composición farmacéutica es adecuada para administración intramuscular.
- Los componentes de la composición farmacéutica se pueden suministrar por separado o mezclarse entre sí en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dosificarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.
- En algunos casos, la composición farmacéutica se suministra como un polvo liofilizado seco esterilizado que puede reconstituirse a la concentración apropiada para administración a un sujeto. En algunos casos, los polipéptidos se suministran como un concentrado sin agua. En algunos casos, el polipéptido se suministra como un polvo liofilizado seco estéril en una dosis unitaria de al menos 0,5 mg, al menos 1 mg, al menos 2 mg, al menos 3 mg, al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 30 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg o al menos 75 mg.
- En otro caso, la composición farmacéutica se suministra en forma líquida. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en forma líquida y está sustancialmente exenta de tensioactivos y/o sales inorgánicas. En algunos casos, el polipéptido se suministra como una forma líquida en una dosificación unitaria de al menos 0,1 mg/ml, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 3 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml o al menos 60 mg/ml.
- En algunos casos, la composición farmacéutica se formula como una forma salina. Las sales farmacéuticamente

aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

- 5 En uso terapéutico, el experto determinará la posología más apropiada según un tratamiento preventivo o curativo y según la edad, el peso, la fase de la infección y otros factores específicos del sujeto para tratar. En determinados casos, las dosis son de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg por día para un adulto, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 250 mg por día o de aproximadamente 10 a 50 mg por día para un adulto. En determinadas realizaciones, las dosis son de aproximadamente 5 a aproximadamente 400 mg por día o de 25 a 10 200 mg por día por adulto. En determinados casos, también se contemplan tasas de dosis de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg por día.

#### *Métodos de uso para terapia o profilaxis*

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

- 20 Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o composición es una cantidad que es eficaz para reducir la gravedad, la duración y/o los síntomas de una enfermedad o afección particular. La cantidad del polipéptido o composición que será terapéuticamente eficaz en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad particular se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. La cantidad precisa del polipéptido o 25 composición para administrar dependerá, en parte, de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad o afección particular y debe decidirse según el criterio del experto y las circunstancias de cada sujeto.

- En algunos casos, la cantidad eficaz del polipéptido proporcionado en el presente documento está entre aproximadamente 0,025 mg/kg y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal de un sujeto humano. En 30 determinados casos, el polipéptido se administra a un sujeto humano en una cantidad de aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 950 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 900 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 850 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 800 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 750 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 700 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 650 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 600 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 550 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 450 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 95 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 85 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal o menos, aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal o menos o aproximadamente 65 mg/kg de peso corporal o menos.

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

- 55 La composición farmacéutica del método puede administrarse usando cualquier método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En algunos casos, la composición se administra por vía intravenosa. 60 En algunos casos, la composición se administra por vía intramuscular.

#### *Métodos de uso para detección o diagnóstico*

- 65 Los polipéptidos proporcionados en el presente documento pueden usarse para la detección de cualquier diana o para el diagnóstico de cualquier enfermedad o afección que el experto en la materia considere adecuada. Los métodos abarcan la detección de la unión de un polipéptido a una diana en una ubicación apropiada, por ejemplo, el

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

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

En el presente documento se describen adicionalmente kits para la detección o el diagnóstico. Los kits ilustrativos comprenden uno o más polipéptidos proporcionados en el presente documento junto con uno o más reactivos útiles para la detección de un complejo entre el o los anticuerpos y sus dianas.

#### *Preparación de polipéptidos que comprenden un aminoácido modificado*

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier técnica evidente para los expertos en la materia, sin limitación. Las técnicas útiles para la preparación incluyen síntesis *in vivo*, por ejemplo con ARNt modificado y ARNt sintetasa, síntesis sin células, por ejemplo con ARNt modificado y ARNt sintetasa, síntesis de polipéptidos en fase sólida y síntesis de polipéptidos en fase líquida. En esta sección y en los ejemplos en el presente documento se describen técnicas ilustrativas. En realizaciones particulares, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En determinados métodos, el polipéptido se traduce y/o transcribe a partir de uno o más polinucleótidos que codifican el polipéptido. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos capaces de codificar los polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitio en una o más cadenas polipeptídicas. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos comprenden un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido en la posición de polinucleótido correspondiente a la posición de polipéptido específica de sitio para el aminoácido modificado. Los ejemplos de dichos codones incluyen codones de terminación, codones de 4 pb, codones de 5 pb y similares. Normalmente, la mezcla de reacción comprende una ARNt sintetasa capaz de producir ARNt que complementan (suprimen) dicho codón. Estos ARNt supresores se unen a los aminoácidos modificados para facilitar su incorporación en el polipéptido en el sitio del codón supresor.

Los polipéptidos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia para expresar polinucleótidos para incorporar aminoácidos modificados en posiciones específicas de sitio de un polipéptido. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 7.045.337 y 7.083.970, en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos publicadas n.º 2008/0317670, US 2009/0093405, US 2010/0093082, US 2010/0098630, US 2008/0085277 y en las publicaciones de patentes internacionales n.º WO 2004/016778 A1 y WO 2008/066583 A2.

En determinadas realizaciones, se puede preparar un polipéptido en una mezcla de reacción sin células que comprende al menos un ARNt ortogonal aminoacilado con un aminoácido modificado, donde el ARNt ortogonal forma pares de bases con un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido, por ejemplo, un codón de terminación; un codón de 4 pb, etc. La mezcla de reacción también comprende una ARNt sintetasa capaz de aminoacilar el ARNt ortogonal con un aminoácido modificado. Una ARNt sintetasa que se puede usar se muestra como SEQ ID NO: 55 y 56 en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º 2008/0233611. También se puede usar ARNt de *M. jannaschii* de tirosilo de tipo silvestre. Habitualmente, la ARNt sintetasa ortogonal, que es susceptible a la degradación por proteasas presentes en extractos de células bacterianas, se sintetiza de forma exógena y se añade a la mezcla de reacción antes del inicio de la síntesis del polipéptido. El ARNt ortogonal se puede sintetizar en las células bacterianas a partir de las que se obtiene el extracto celular, se puede sintetizar *de novo* durante la reacción de síntesis del polipéptido o se puede añadir de forma exógena a la mezcla de reacción.

En determinadas realizaciones, se añaden de forma opcional a la mezcla de reacción componentes que afectan a la inserción de aminoácidos modificados y la inserción o el plegamiento de proteínas. Dichos componentes incluyen concentraciones elevadas de factores de traducción para minimizar el efecto del factor de liberación 1 y 2, y para optimizar adicionalmente las concentraciones de componentes ortogonales. Se pueden añadir proteínas chaperonas (Sistema Dsb de oxidoreductasas e isomerasas, GroES, GroEL, DNAJ, DNAK, Skp, etc.) de forma exógena a la mezcla de reacción o se puede sobreexpresar en las células de origen utilizadas para preparar el extracto celular. Las reacciones pueden utilizar un reactor a gran escala, a pequeña escala o pueden hacerse múltiples para realizar una pluralidad de síntesis simultáneas. Las reacciones continuas utilizarán un mecanismo de alimentación para introducir un flujo de reactivos y poder aislar el producto final como parte del proceso. Los sistemas discontinuos también son de interés, donde se pueden introducir reactivos adicionales para prolongar el periodo de tiempo para síntesis activa. Un reactor se puede ejecutar en cualquier modo, tal como discontinuo, discontinuo extendido,

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

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

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

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

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

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

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

El polipéptido resultante se puede purificar o aislar mediante técnicas convencionales. Se proporcionan técnicas ilustrativas en los ejemplos del presente documento.

#### *Métodos de ensayo*

Los anticuerpos pueden ensayarse para determinar su actividad esperada, o para determinar una nueva actividad, según cualquier ensayo evidente para los expertos en la materia. El polipéptido resultante puede ensayarse para determinar la actividad en un ensayo funcional o cuantificando la cantidad de proteína presente en un ensayo no funcional, por ejemplo, inmunotinción, ELISA, cuantificación en gel teñido con coomasie o plata, etc., y determinando la relación de proteína biológicamente activa con respecto a proteína total.

La cantidad de proteína producida en una reacción de traducción se puede medir de diversos modos. Un método se basa en la disponibilidad de un ensayo que mide la actividad de la proteína particular que se traduce. Un ejemplo de

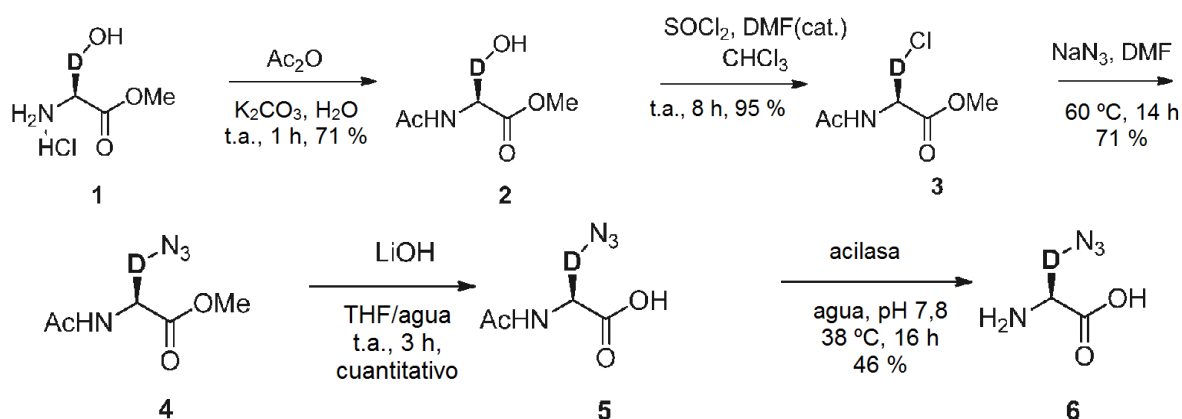
un ensayo para medir la actividad proteica es un sistema de ensayo de luciferasa o un sistema de ensayo de cloranfenicol acetil transferasa. Estos ensayos miden la cantidad de proteína funcionalmente activa producida a partir de la reacción de traducción. Los ensayos de actividad no medirán la proteína de longitud completa que está inactiva debido al plegamiento incorrecto de la proteína o la falta de otras modificaciones postraduccionales necesarias para la actividad proteica.

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

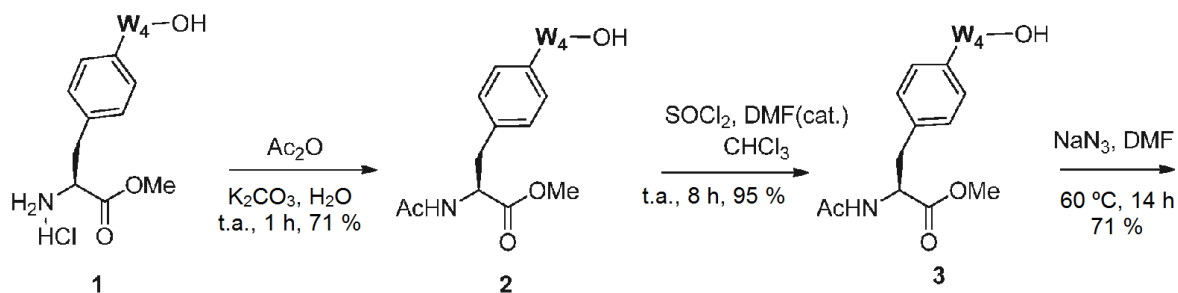
#### 15 Preparación de Aminoácidos Modificados

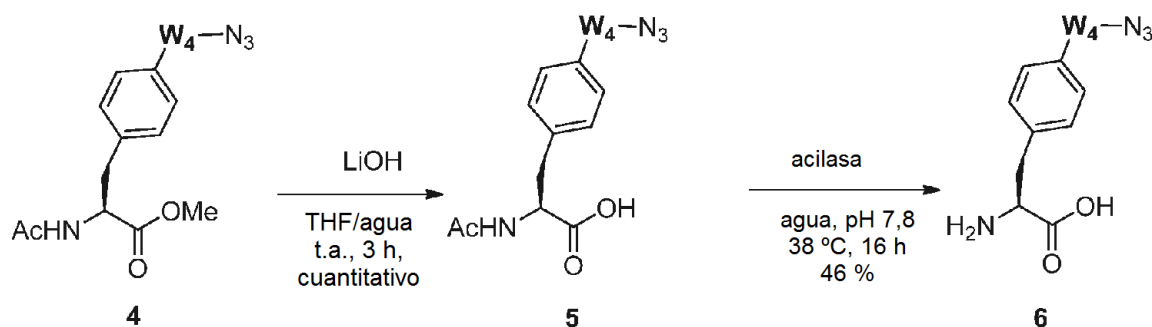
Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden prepararse, aislarse u obtenerse por cualquier método evidente para los expertos en la materia. Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden prepararse de acuerdo con el Esquema de Preparación General proporcionado en el presente documento. Las condiciones de reacción, etapas y reactivos no proporcionados en el Esquema de Preparación General serían evidentes y conocidos para los expertos en la materia.

#### Esquema de Preparación General 1a



#### Esquema de Preparación General 1b





En el Esquema de Preparación General **1a, D** se define como se describe en el contexto de la fórmula I. En el Esquema de Preparación General **1b, W<sub>4</sub>** se define como se describe en el contexto de la fórmula II.

## 5 Ejemplos

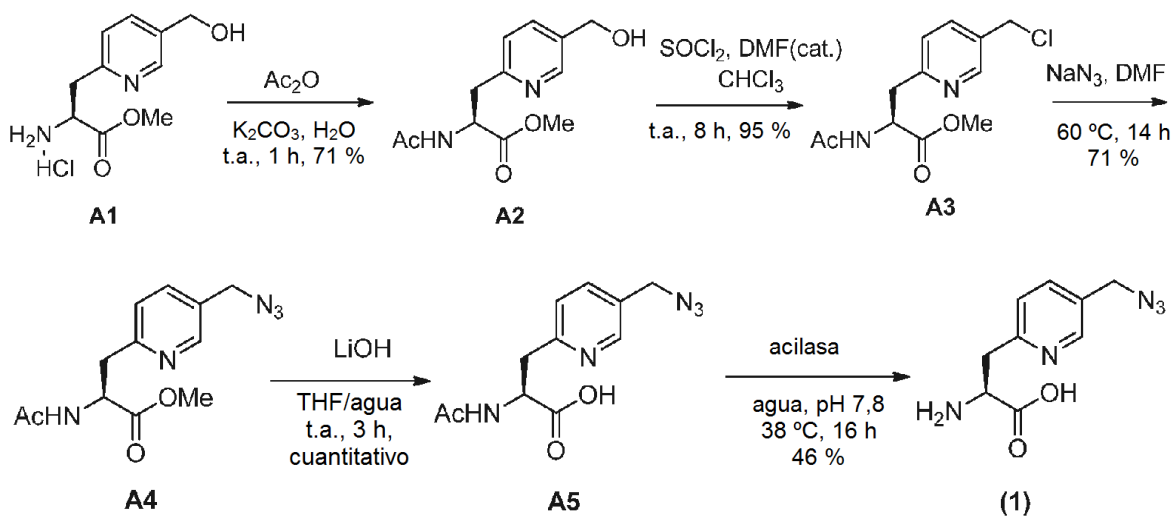
Como se usa en la presente memoria, los símbolos y convenciones utilizados en estos procedimientos, esquemas y ejemplos, independientemente de si se define específicamente una abreviatura particular, concuerdan con los usados en la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Biological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

10

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

## 15 Ejemplo 1

Preparación de Ácido 2-Amino-3-(5-azidometil-piridin-2-il)-propiónico comparativo (1)



20

### Preparación del compuesto A2

25 Se añadió lentamente anhídrido acético (0,42 ml, 4,5 mmol, 1,1 equiv.) a una solución de **A1** (sal de HCl, 1,0 g, 4,1 mmol, 1 equiv.) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,18 g, 8,6 mmol, 2,1 equiv.) en agua (20 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El agua se retiró en un evaporador rotatorio y el residuo se trató con metanol. El sólido se retiró por filtración. La solución de metanol se concentró y el residuo se purificó por FCC (MeOH/DCM = 1/10) para proporcionar la acetamida **A2** (0,73 g, 71 %) en forma de un sólido de color blanco. CLEM m/z: 253 (M+1).

30

### Preparación del compuesto A3

35 Se añadió lentamente cloruro de tionilo (0,32 ml, 4,3 mmol, 1,5 equiv.) en una solución de la acetamida **A2** (0,73 g, 2,9 mmol, 1 equiv.) y DMF (22  $\mu\text{l}$ , 0,29 mmol) en  $\text{CHCl}_3$  (25 ml) a temperatura ambiente. Después de 4 h, se añadió más cantidad de  $\text{SOCl}_2$  (80  $\mu\text{l}$ , 1,1 mmol) y la mezcla se agitó durante 4 h más. La mezcla de reacción se diluyó con  $\text{CHCl}_3$  (50 ml) y después se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado. La capa acuosa se extrajo dos veces con  $\text{CHCl}_3$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ . El producto en bruto **A3** (0,74 g, 95 %) se usó directamente para la



siguiente reacción. CLEM m/z: 271 (M+1).

#### Preparación del compuesto A4

- 5 Una mezcla del cloruro **A3** (1,33 g, 4,9 mmol, 1 equiv.),  $\text{NaN}_3$  (0,64 g, 9,8 mmol, 2 equiv.) y  $\text{NaI}$  (73 mg, 0,49 mmol, 0,1 equiv.) en DMF (20 ml) se agitó a 60 °C durante 15 h. Después, la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El producto en bruto se purificó por FCC (EA) para proporcionar el producto de azido **A4** (0,95 g, 71 %). CLEM m/z: 278 (M+1).

#### 10 Preparación del compuesto A5

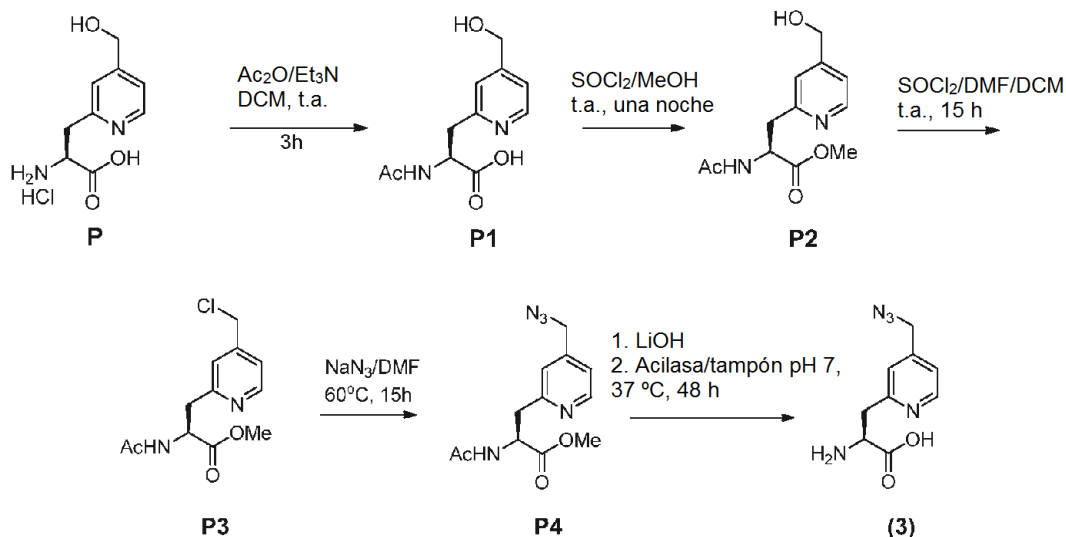
- Una mezcla del éster metílico **A4** (0,95 g, 3,4 mmol, 1 equiv.) y  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0,29 g, 6,8 mmol, 2 equiv.) en THF/agua (6 ml / 3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se neutralizó a pH 7 con  $\text{HCl}$  1 N y después se concentró a sequedad. El producto en bruto **A5** (~0,91 g, cuantitativo) se usó directamente para la siguiente reacción. CLEM m/z: 264 (M+1), 262 (M-1).

#### Preparación del compuesto (1)

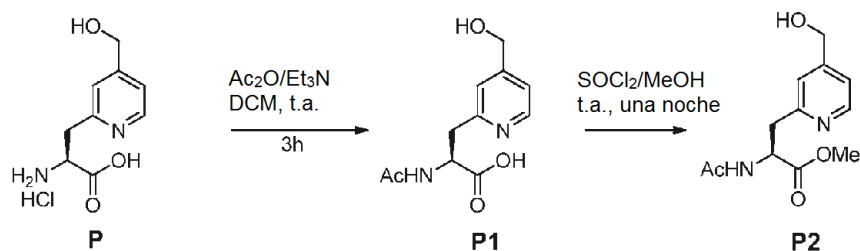
- 20 La Acilasa I (100 mg, Sigma, A3010, Calidad I) se añadió en una solución de la acetamida **A5** (0,91 g, 3,4 mmol) en agua (60 ml). Después de ajustarse el pH de la solución a 7,8 con una solución acuosa 1 N de hidróxido de litio. La mezcla de reacción se agitó a 38 °C durante 16 h. Se añadió carbono activo (2 g) y la solución se agitó durante 10 min. La mezcla se filtró a través de una capa de Celite. El filtrado se concentró a aproximadamente 20 ml, que se usó directamente para purificación por HPLC. Las fracciones que contenían el producto puro (1) se combinaron y se concentraron a sequedad. La muestra final se secó mediante liofilización para proporcionar el aminoácido (1) (0,35 g, 46 %) en forma de un polvo de color blanco. CLEM m/z: 222 (M+1), 220 (M-1). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,36 (s, 1H), 7,71 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,26 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 4,36 (s, 2H), 3,98 (dt,  $J = 2,7$  y 6,5 Hz, 1H), 3,32-3,16 (m, 2H).

#### 30 Ejemplo 2

Preparación del Compuesto de Referencia (3)

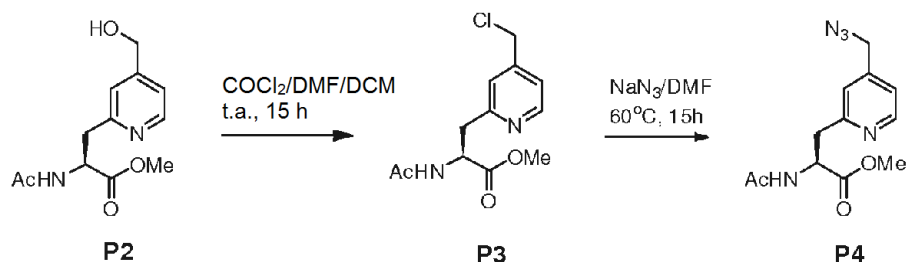


#### Procedimiento general para la preparación del compuesto (3)



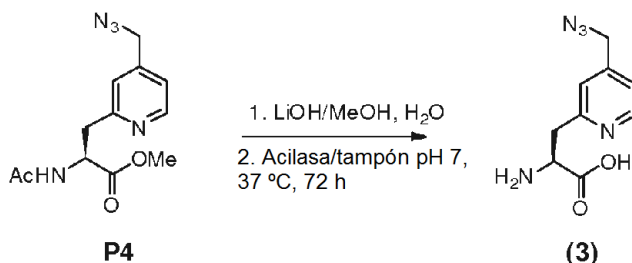
A una solución del aminoácido sustituido con piridina **P** (2 g, 8,6 mmol, 1,0 equiv.) en DCM se añadió trietilamina (3 ml, 21,5 mmol, 2,5 equiv.). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se añadió gota a gota anhídrido acético (0,974 ml, 10,3 mmol, 1,2 equiv.) durante 5 min. La mezcla se calentó a ta y se agitó durante 3 h. Todos los disolventes y materiales volátiles se retiraron y el residuo (en bruto **P1**) se secó al vacío y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El material en bruto **P1** anterior se disolvió en metanol anhidro (20 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (1,87 ml, 25,8 mmol, 3,0 equiv.) durante 10 min. La mezcla se calentó hasta y se agitó durante una noche. El disolvente se retiró, se disolvió en acetato de etilo/ NaHCO<sub>3</sub> (3 x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para dar **P2** en bruto, que se purificó mediante una columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 9:1) para dar **P2** (550 mg, 25 %).



A una solución de **P2** (550 mg, 2,18 mmol, 1,0 equiv.) en cloroformo (10 ml) se añadieron 2 gotas de DMF. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se añadió gota a gota cloruro de tionilo (634 µl, 8,72 mmol, 4 equiv.) durante 5 min. La mezcla se calentó a ta y se agitó durante una noche. La reacción se trató con DCM/NaHCO<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se purificó mediante columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 9:1) para dar el producto **P3** (450 mg, 76 %).

A una solución de **P3** (450 mg, 1,67 mmol, 1,0 equiv.) en DMF (10 ml) se añadió NaN<sub>3</sub> (217 mg, 3,34 mmol, 2,0 equiv.) y NaI (25 mg, 0,167 mmol, 0,1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante una noche. La reacción se trató con DCM/NaHCO<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se purificó por HPLC prep. para dar el producto **P4** (400 mg, 86 %).

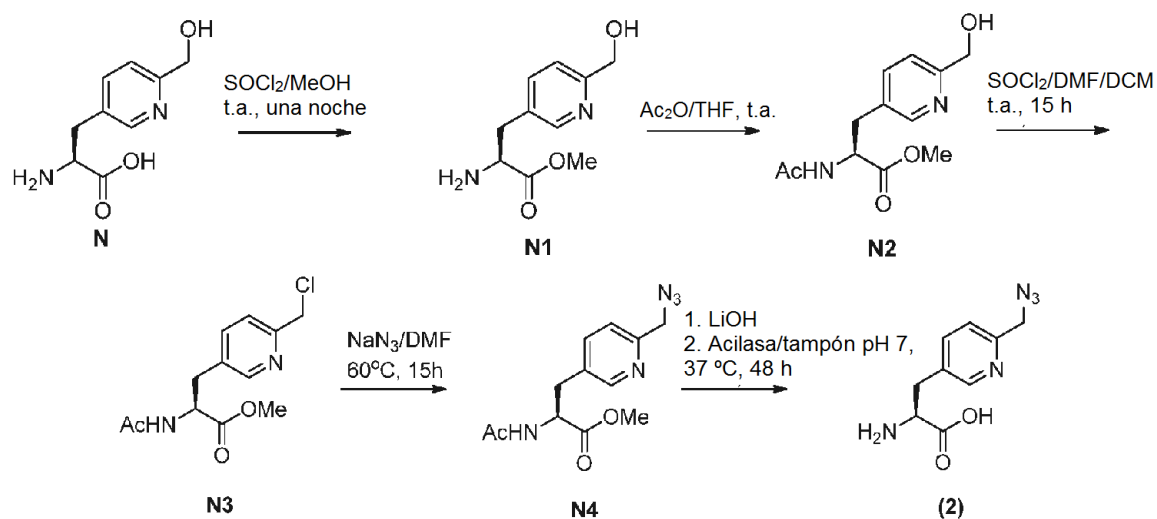


A la solución de **P4** (400 mg, 1,44 mmol, 1,0 equiv.) en MeOH (5 ml) se añadió LiOH (303 mg, 7,2 mmol, 5 equiv., en 5 ml de H<sub>2</sub>O). La reacción se agitó a ta durante 2 h. El disolvente se retiró y el residuo se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución del residuo anterior en una pequeña cantidad de DMSO y tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (20 ml) se añadió acilasa (100 mg) en tampón de 5 ml. La mezcla se calentó a 37 °C durante 72 h. Se añadió carbón vegetal (200 mg) en la reacción y se agitó a ta durante 10 min, se filtró a través de una capa de Celite. El filtrado se concentró y se purificó por HPLC prep. para dar el producto **(3)** (85 mg) como la sal de HCl. CL-EM (IEN): 222 (M+1), 220 (M-1). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,50 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,49 (s, 2H), 4,03 (m, 1H), 3,42 (dd, 1H, *J* = 3,6 y 12,0 Hz, 1H), 3,27 (m, 2H).

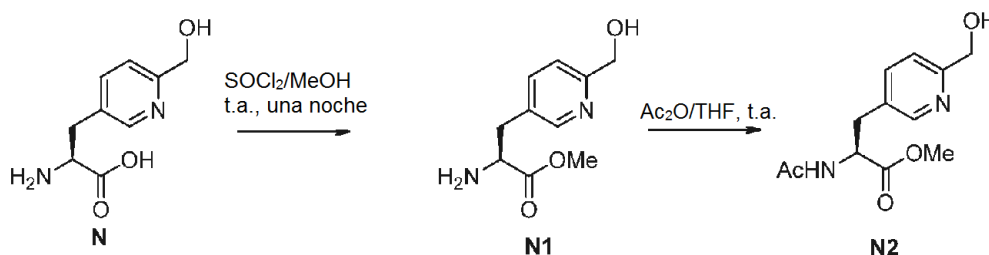
### Ejemplo 3

Preparación de compuesto de referencia (**2**)



**Procedimiento general para la preparación del compuesto (2)**

5

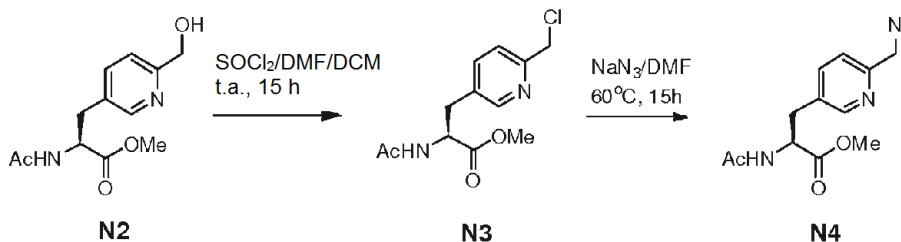


10

A una solución del aminoácido sustituido con piridina **N** (2 g, 8,6 mmol, 1,0 equiv.) en metanol (20 ml) a 0 °C se añadió gota a gota cloruro de tionilo (1,25 ml, 17,82 mmol, 2,0 equiv.) durante 10 min. La mezcla se agitó a ta durante una noche. El disolvente se retiró para dar un residuo (**N1** en bruto), que se secó al vacío y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

15

A una solución de **N1** en bruto y trietilamina (4,8 ml, 34,4 mmol, 4,0 equiv.) en THF (20 ml) a 0 °C se añadió gota a gota anhídrido acético (1,22 ml, 12,9 mmol, 1,5 equiv.) durante 10 min. La mezcla se agitó a ta durante 3 h. La reacción se diluyó con DCM y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (3 x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se purificó mediante columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 9:1) para dar el producto **N2** (1,0 g, 46 %).



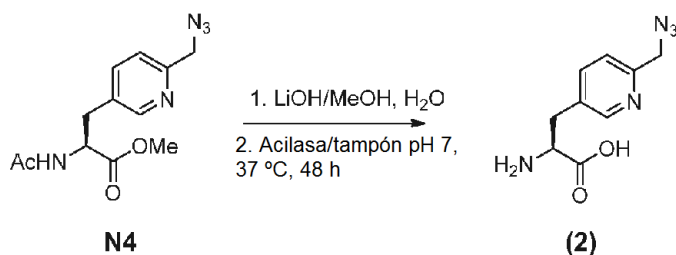
20

A una solución de **N2** (2 g, 7,94 mmol, 1,0 equiv.) en cloroformo (20 ml) se añadieron 4 gotas de DMF. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se añadió gota a gota cloruro de tionilo (2,3 ml, 31,76 mmol, 4 equiv.) durante 10 min. La mezcla se agitó a ta durante una noche. La reacción se trató con DCM/NaHCO<sub>3</sub>. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se purificó mediante columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 9:1) para dar el producto **N3** (1 g, 47 %).

25

A una solución de **N3** (1 g, 3,7 mmol, 1,0 equiv.) en DMF (20 ml) se añadió NaN<sub>3</sub> (481 mg, 7,4 mmol, 2,0 equiv.) y NaI (55,5 mg, 0,37 mmol, 0,1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C en un baño de aceite durante una noche. La reacción se diluyó con DCM. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se purificó mediante columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 9:1) para dar el producto **N4** (1,8 g, 98 %) en forma de un aceite de color amarillo.

30

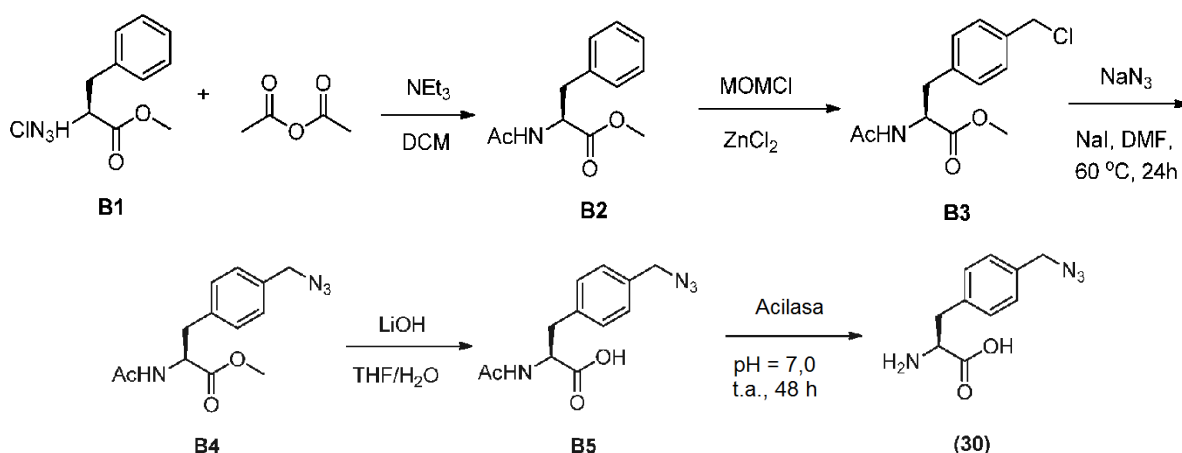


5 A una solución de **N4** (1 g, 3,6 mmol, 1,0 equiv.) en MeOH (20 ml) se añadió LiOH (757 mg, 18 mmol, 5 equiv., en 10 ml de agua). La reacción se agitó a t.a. durante 2 h. El disolvente se retiró y el residuo se usó directamente para la siguiente etapa sin purificación adicional.

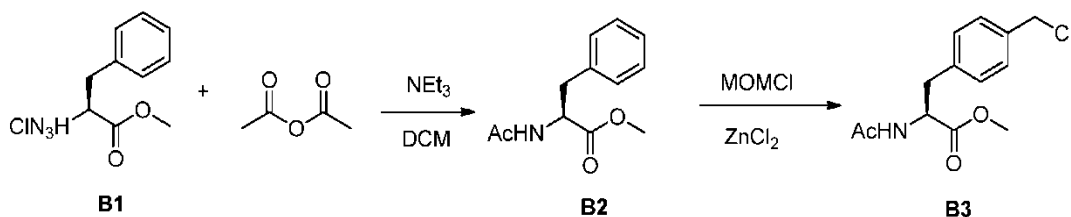
10 A una solución del residuo anterior en una pequeña cantidad de DMSO y tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (100 ml se añadió acilasa (100 mg). La mezcla se calentó a 37 °C durante 48 h. Se añadió carbón vegetal (200 mg) en la mezcla de reacción y se agitó a t.a. durante 10 min, se filtró sobre Celite. El filtrado se concentró y se recristalizó en MeOH para dar el producto **(2)** (1,3 g). CL-EM (IEN): 222 (M+1), 220 (M-1). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8,44 (s, 1H), 7,76 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,33 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 4,44 (s, 2H), 3,45 (m, 1H), 2,98-3,12 (m, 2H), 3,27 (m, 2H).

#### Ejemplo 4

15 Preparación del compuesto **(30)**

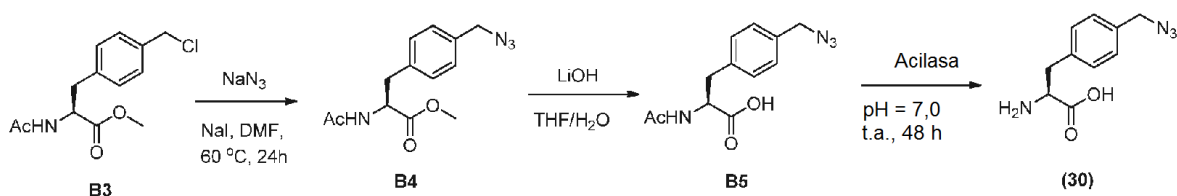


20 **Procedimiento general para la preparación del compuesto (30)**



25 A una solución del éster metílico de Phe **B1** (50 g, 232 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (300 ml) se añadió trietilamina (81 ml, 580 mmol, 2,5 equiv.) a 0 °C, se añadió gota a gota anhídrido acético (33 ml, 348 mmol, 1,5 equiv.) durante 15 min. La mezcla se agitó a t.a. durante 3 h. La reacción se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (2 x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se purificó mediante columna de gel de sílice ( $\text{DCM:MeOH} = 9:1$ ) para dar el producto **B2** (50 g, 97 %) en forma de un sólido de color blanco.

30 Una mezcla del éster **B2** (52 g, 0,235 mol, 1,0 equiv.), MOM-Cl (136 ml, 1,79 mole, 7,6 equiv.) y  $\text{ZnCl}_2$  (128 g, 0,94 mol, 4,0 equiv.) se agitó a 6-8 °C durante 8 h. Después de retirar el material volátil en un evaporador rotatorio a 6-8 °C, el residuo se vertió en hielo-agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron a un pequeño volumen. Después, se añadió éter (50 ml). La solución de éter se mantuvo en un frigorífico a -20 °C durante una noche. El producto cristalizado se filtró y se secó al vacío para dar el producto **B3** (31 g, 49 %) en forma de un sólido de color blanco.



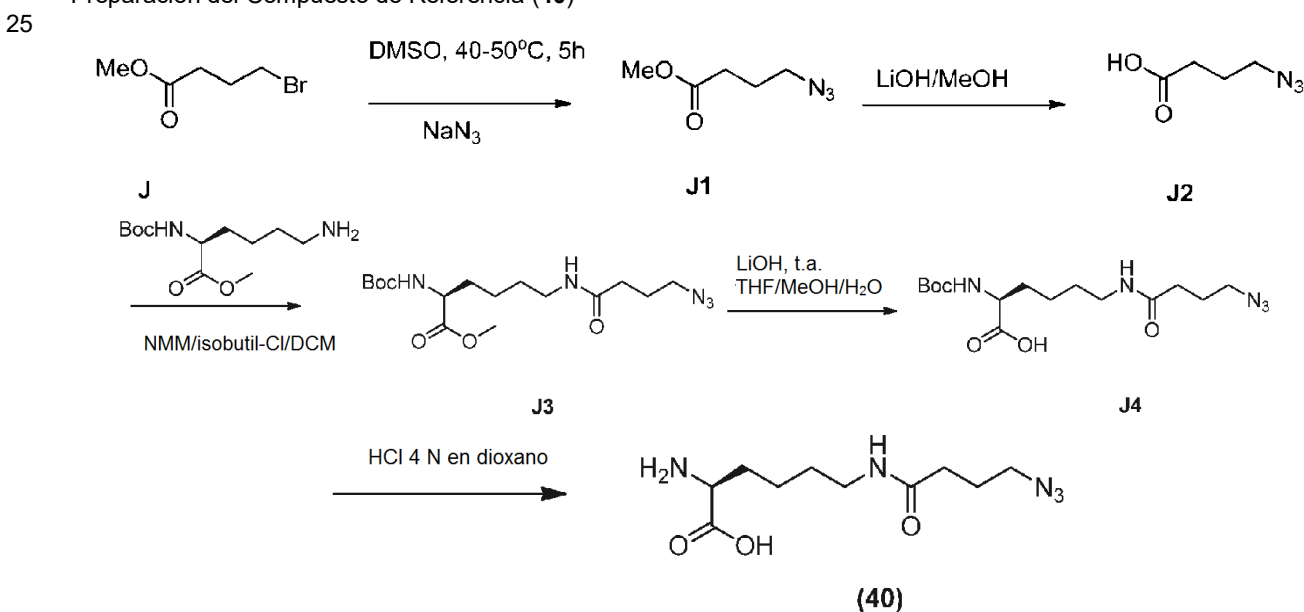
5 A una solución de **B3** (20 g, 74,2 mmol, 1,0 equiv.) en DMF (100 ml) se añadió  $\text{NaN}_3$  (9,64 g, 148 mmol, 2,0 equiv.) y NaI (1,11 g, 7,42 mmol, 0,1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C en un baño de aceite durante una noche. El disolvente de DMF se retiró en un evaporador rotatorio, y la mezcla de reacción se disolvió en acetato de etilo, y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (3 x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se purificó mediante columna de gel de sílice (DCM:MeOH = 9:1) para dar el producto **B4** (20,5 g, 100 %) en forma de un aceite de color amarillo.

10 A una solución de **B4** (20 g, 72,4 mmol, 1,0 equiv.) en una solución mixta de THF: MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml: 50 ml: 20 ml) se añadió  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (6,94 g, 144,8 mmol, 2 equiv.). La reacción se agitó a ta durante 2 h. El disolvente se retiró para dar un residuo, que se trató con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (3 x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró para dar el producto **B5** (18,3 g, 96 %) en forma de un aceite de color amarillo.

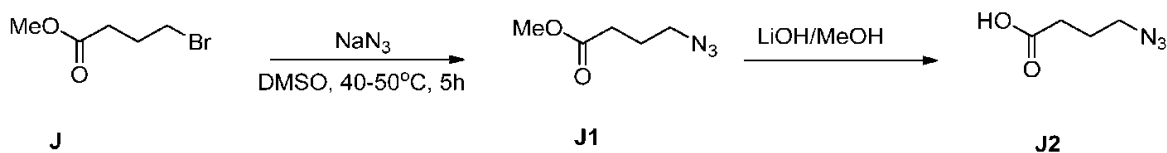
15 A una solución de la amida **B5** anterior (18 g, 68,7 mmol) en DMSO (20 ml) y tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (1,8 l) se añadió acilasa (1 g). La solución se calentó a 37 °C durante 48 h. Se añadió carbón vegetal (20 g) en la mezcla de reacción y se agitó a ta durante 10 min, se filtró a través de Celite. El filtrado se lavó con acetato de etilo. La capa acuosa se concentró a un pequeño volumen y el producto precipitó en forma de un sólido de color blanco. El sólido se filtró y se secó al vacío para dar el producto (30) (10 g, 66 %) en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (IEN): 221 (M+1). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,27 (s a, 4H), 4,37 (s, 2H), 3,43 (m, 2H), 3,17 (m, 1H), 2,84 (m, 2H).

### Ejemplo 5

#### Preparación del Compuesto de Referencia (40)



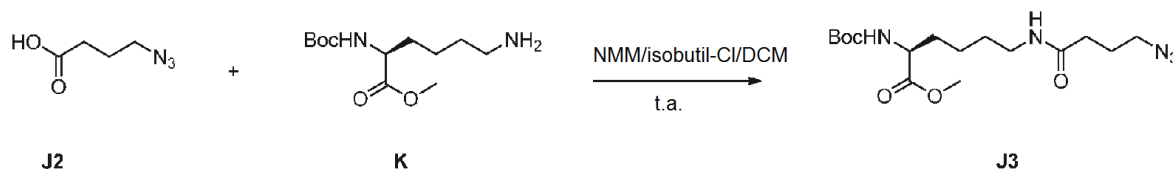
#### 30 Procedimiento general para la preparación del compuesto (40)



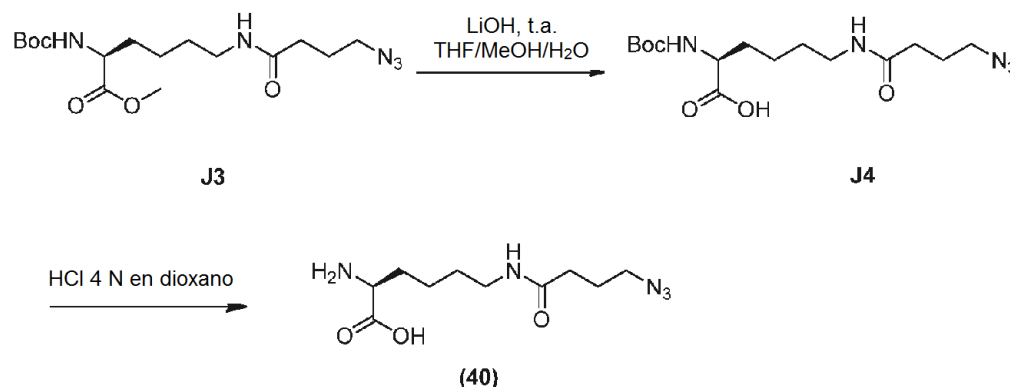
35 A una solución de **J** (10 g, 55,2 mmol, 1,0 equiv.) en DMSO (100 ml) se añadió en varias porciones azida sódica (5,4 g, 82,8 mmol, 1,5 equiv.) con agitación. La mezcla se calentó a 40-50 °C durante 5 h. Después de enfriarse a ta, la mezcla se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con éter (3 x). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera,

se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró para dar el producto **J1** (7,8 g, 98,7 %) en forma de un aceite.

El producto anterior **J1** (7,8 g, 54,5 mmol) se suspendió en una mezcla de LiOH (11,4 g, 274 mmol, 5,0 equiv.) en agua (100 ml) y MeOH (20 ml). La mezcla se dejó en agitación a ta durante 1 h, se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con éter (3 x). La capa acuosa se acidificó con HCl 1 N a pH 2 y se extrajo con éter (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron para dar el producto **J2** (7 g, 100 %) en forma de un aceite.



A una solución de **J2** (500 mg, 3,88 mmol, 1,0 equiv.) en DCM a 0 °C se añadió N-metil morfolina (NMM, 510 µl, 4,65 mmol, 1,2 equiv.) y cloroformiato de isobutilo (607 µl, 4,65 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla se agitó a ta durante 2 h. A la solución anterior se añadió éster metílico de Boc-Lys (1,15 g, 3,88 mmol, 1,0 equiv.). La mezcla se agitó a ta durante 3 h, se inactivó con agua. La reacción se extrajo con DCM (3 x). La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y después se concentró para dar el producto **J3** (900 mg, 63 %) en forma de un aceite.



A una solución de **J3** (900 mg, 2,42 mmol, 1,0 equiv.) en una mezcla de THF: MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml: 3 ml: 2 ml) se añadió LiOH (508 mg, 12,1 mmol, 5,0 equiv.). La mezcla se dejó en agitación a ta durante 1 h, se concentró a sequedad para dar la sal sódica en bruto **J4**.

El **J4** en bruto se trató con HCl 4 N en dioxano (10 ml) y se agitó a ta durante 1 h, se concentró para dar el producto en bruto **(40)**, que se purificó por HPLC prep. para dar **(40)** puro (332 mg, 53 %) en forma de un sólido de color blanco. CL-EM (IEN): 258 (M+1), 256 (M-1). RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3,52 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 1H), 3,15 (t,  $J$  = 6,6 Hz, 2H), 2,99 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 2H), 2,12 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 2H), 1,66 (m, 4H), 1,35 (m, 2H), 1,18 (m, 2H).

## Ejemplo 6

Evaluación de la reactividad de los compuestos **(30)** y **(40)**

Este ejemplo proporciona una evaluación de la velocidad de reacción de los compuestos **(30)** y **(40)** en comparación con un compuesto de referencia, p-azido-fenilalanina **(50)**.

El análogo de DBCO **(60)** se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Los análogos de aminoácidos **(30)**, **(40)** y **(50)** se diluyeron en serie en tampón de PBS en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos hasta un volumen de 180  $\mu\text{l}$ . Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de solución de reserva de análogo de DBCO a cada pocillo y la cinética de la pérdida de DBCO para formar el aducto de adición se controló a 310 nm mediante absorbancia utilizando un lector de placas SpectraMax a 25 °C. Un esquema de la reacción de los compuestos **(30)**, **(40)** y **(50)** con el compuesto **(60)** se muestra en la Figura 1. La cinética ajusta con precisión una degradación de primer orden con  $A_{310} = A_0^* (1 - \exp(-k_{\text{obs}} t))$ , donde  $k_{\text{obs}}$  es la constante de velocidad de pseudo primer orden con unidades de  $\text{s}^{-1}$  en condiciones donde [compuesto de azida]  $\gg$  [DBCO]. Un diagrama de  $k_{\text{obs}}$  frente a [Azida] produce la constante de velocidad de segundo orden (unidades de  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) para cada aminoácido, una medida de la reactividad química intrínseca de cada aminoácido.

Los resultados del experimento se muestran como la Figura 2. Sorprendentemente, los compuestos **(30)** y **(40)** presentaron una constante de velocidad de primer orden de 1,4  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , aproximadamente 7 veces mayor que la

constante de velocidad de primer orden de  $0,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para el compuesto (50). Se realizaron experimentos similares para evaluar la reactividad de los compuestos (1), (2) y (3); la reacción de los compuestos (1), (2) y (3) estaba completa en más del 90 % en 30 minutos y completa en menos de 2 horas, lo que sugiere que los compuestos (1), (2) y (3) presentan constantes de velocidad similares a las de los compuestos (30) y (40).

5

### Ejemplo 7

Incorporación del compuesto (30) en un polipéptido a modo de ejemplo, GFP

Este ejemplo describe la incorporación del compuesto (30) en proteína verde fluorescente. Para supervisar la síntesis de GFP, el ADN que codifica turboGFP que contiene un codón ámbar (codón de terminación) antes de que el cromóforo se clonara en el vector de expresión de OCFS pYD317. El codón de terminación (TAG) se insertó mediante mutagénesis de PCR solapante en los nucleótidos correspondientes al aminoácido tirosina en el aminoácido 50 según la estructura cristalina de turboGFP (pdb 2G6X). Estudios previos de este sitio demostraron que las sustituciones no aromáticas en esta posición dieron como resultado una ausencia de fluorescencia y que la supresión con un nAA aromático en el codón de terminación dará como resultado fluorescencia.

15

Las reacciones se incubaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en un espectrofotómetro (Molecular Devices, SpectraMaxM5) durante cinco horas con una cubierta adhesiva (VWR, 9503130) y la intensidad de fluorescencia se midió a intervalos de 10 minutos,  $\lambda_{\text{Ex}} = 476 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{Em}} = 51$ . Se añadió la mezcla de reacción de OCFS inmediatamente a la microplaca para un volumen de reacción final de  $30 \mu\text{l}$  que contenía de extracto de S30 30 %, ARN polimerasa T7  $24 \mu\text{g/ml}$ , L-tirosina  $1 \text{ mM}$  (Sigma, T8566), premezcla\*, ARNt  $10 \mu\text{M}$ , pCNFRS D286R  $5 \mu\text{M}$ , Compuesto (30)  $1 \text{ mM}$  y plásmido turboGFP  $3 \text{ nM}$  (Evrogen, Rusia, subclonado en un vector PYD317) en agua tratada con DEPC (G Biosciences, 786-109). Se usó una reacción de control positivo usando turboGFP sin el codón de terminación para asegurar que las reacciones se realizaran con velocidades similares a las observadas previamente, mientras que las reacciones que contenían turboGFP Y50TAG también se procesaron sin ARNt para asegurar que no se detectaba fluorescencia (control negativo) en ausencia del sistema responsable de la incorporación de pAMF. La incorporación de pAMF en GFP consigue rendimientos relativamente altos de proteína de una manera específica de sitio. La Figura 3 muestra un ciclo temporal para la incorporación de pAMF en el sitio Y50TAG en GFP.

25

### 30 Ejemplo 8

Incorporación del compuesto (30) en un polipéptido a modo de ejemplo, GM-CSF

El ADN que codifica GMCSF humano con codón ámbar se clonó en el vector de expresión pYD317. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR solapante en los nucleótidos correspondientes al aminoácido serina en la posición 6.

35

Los extractos sin células que contenían ARNt CUA se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron con yodoacetamida  $50 \mu\text{M}$  durante 30 min. Las reacciones sin células se procesaron a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante hasta 10 h que contenían 30 % (v/v) de extracto tratado con yodoacetamida con glutamato de magnesio  $8 \text{ mM}$ , glutamato de amonio  $10 \text{ mM}$ , glutamato de potasio  $130 \text{ mM}$ , piruvato de sodio  $35 \text{ mM}$ , AMP  $1,2 \text{ mM}$ ,  $0,86 \text{ mM}$  de cada uno de GMP, UMP y CMP, aminoácidos  $2 \text{ mM}$  para los 18 aminoácidos, excepto tirosina y fenilalanina, que se añadieron a  $0,5 \text{ mM}$ , oxalato de sodio  $4 \text{ mM}$ , putrescina  $1 \text{ mM}$ , espermidina  $1,5 \text{ mM}$ , fosfato de potasio  $15 \text{ mM}$ , ARNP T7  $100 \text{ nM}$ , DsbC de *E. coli*  $1,3 \mu\text{M}$ , glutatión oxidado (GSSG)  $2 \text{ mM}$ , ARNt sintetasa  $1 \mu\text{M}$  y compuesto (30)  $1 \text{ mM}$ . Las concentraciones del plásmido variante GMCSF TAG fueron  $5 \mu\text{g/ml}$ . Para marcar proteína sintetizada con  $^{14}\text{C}$ , también se añadió a la reacción 3,33 % (v/v) de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -leucina ( $300 \text{ mCi/mmol}$ ; GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

45

Para el gel reductor, se mezclaron  $4 \mu\text{l}$  de muestra,  $1 \mu\text{l}$  de DTT  $1 \text{ M}$ ,  $7 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DI y  $4 \mu\text{l}$  de tampón LDS 4X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se calentaron en una transferencia en caliente a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Las muestras se analizaron mediante geles de SDS-PAGE de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se secaron y se analizaron mediante autorradiografía usando un Storm 840 PhosphorImager después de aproximadamente 16 horas de exposición.

50

La autorradiografía demostró que se realizó un compuesto que contenía GMCSF de longitud completa intacto (30).

55

### Ejemplo 9

Incorporación del compuesto (30) en un polipéptido a modo de ejemplo, IgG

60

Para demostrar la viabilidad de incorporación del compuesto (30) en IgG, El ADN que codifica la cadena pesada de trastuzumab que contiene un codón ámbar y el ADN que codifica la cadena ligera de trastuzumab se clonaron en el vector de expresión pYD317. El codón TAG se insertó mediante mutagénesis por PCR solapante en los nucleótidos correspondientes al aminoácido serina en la posición (136) por el índice de EU en el dominio CH1.

65

Los extractos sin células se descongelaron a temperatura ambiente y se incubaron con yodoacetamida  $50 \mu\text{M}$

durante 30 min. Las reacciones sin células se procesaron a 30 °C durante hasta 10 h que contenían 30 % (v/v) de extracto tratado con yodoacetamida con glutamato de magnesio 8 mM, glutamato de amonio 10 mM, glutamato de potasio 130 mM, piruvato de sodio 35 mM, AMP 1,2 mM, 0,86 mM de cada uno de GMP, UMP y CMP, aminoácidos 2 mM para los 18 aminoácidos, excepto tirosina y fenilalanina, que se añadieron a 0,5 mM, oxalato de sodio 4 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1,5 mM, fosfato de potasio 15 mM, ARNP T7 100 nM, DsbC de *E. coli* 1,3 µM, Levadura PDI 5 µM, glutatión oxidado (GSSG) 2 mM, ARNt 15 µM, ARNt sintetasa 1 µM y compuesto (30) 1 mM. Las concentraciones de plásmido variante de TAG de cadena pesada y plásmido de cadena ligera de tipo silvestre fueron 7,5 µg/ml y 2,5 µg/ml respectivamente. Para marcar proteína sintetizada con <sup>14</sup>C, también se añadió a la reacción 3,33 % (v/v) de l-[U-<sup>14</sup>C]-leucina (300 mCi/mmol; GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

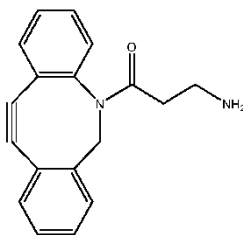
Para el gel no reductor, se mezclaron 4 µl de muestra, 8 µl de H<sub>2</sub>O DI y 4 µl de tampón LDS 4X (Invitrogen, Carlsbad, CA) antes de cargarlos en el gel. Para el gel reductor, se mezclaron 4 µl de muestra, 1 µl de DTT 1 M, 7 µl de H<sub>2</sub>O DI y 4 µl de tampón LDS 4X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se calentaron en una transferencia en caliente a 70 °C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron mediante geles de SDS-PAGE de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los geles se secaron y se analizaron mediante autorradiografía usando un Storm 840 PhosphorImager después de aproximadamente 16 horas de exposición.

La autorradiografía demostró que se realizó el compuesto intacto de longitud completa que contiene IgG (30).

## Ejemplo 10

Evaluación de la Reactividad de los Compuestos (30), (1) y (2)

Este ejemplo proporciona una evaluación de la velocidad de reacción de los compuestos (30), (1) y (2) con DBCO-NH<sub>2</sub> (61) (mostrado más adelante).



(61)

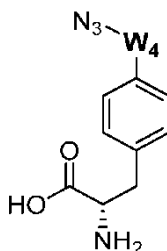
Se disolvió DBCO-NH<sub>2</sub> (61) en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 para producir una solución 500 µM. Los análogos de aminoácido (30), (1) y (2) se disolvieron en el mismo tampón para producir soluciones transparentes 5 mM y después se diluyeron a una concentración de 500 µM usando el mismo tampón. Cien microlitros de cada análogo de aminoácido se mezclaron con 100 µl del compuesto (61) y se creó un vórtice. La absorción del compuesto (61) se controló a 310 nm usando un Espectrómetro NANODROP 1000 UV. Se obtuvieron mediciones a 0, 0,5, 2, 6 y 20 horas. La reducción en la absorción del compuesto (61) es indicativa de su reacción con los análogos de aminoácido.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 4. Los compuestos (1) y (30) reaccionaron fácilmente con el compuesto (61) en una equivalencia 1:1 para producir un rendimiento casi cuantitativo en seis horas. La velocidad de reacción entre el compuesto (1) y el compuesto (61) fue comparable a la velocidad de reacción entre el compuesto (30) y el compuesto (61). La velocidad de reacción entre el compuesto (2) y el compuesto (61) fue de dos a cuatro veces más lenta que la velocidad de reacción entre los otros dos análogos de aminoácido y el compuesto (61). Sin embargo, la velocidad de reacción del compuesto (2) debería ser más rápida que la del compuesto (50) del Ejemplo 6, basado en el compuesto (30) como un comparador común.



REIVINDICACIONES

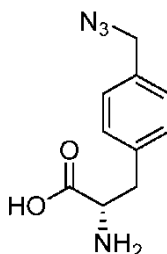
1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula II:



5

Fórmula II;  
o una de sus sales, en la que  $W_4$  es alquileo  $C_1-C_{10}$ .

10 2. El compuesto de la reivindicación 1 de acuerdo con la fórmula 30:



15 (30);  
o una de sus sales.

3. Un polipéptido que comprende uno o más restos de aminoácidos del compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

20 4. Un conjugado que comprende el polipéptido de la reivindicación 3 ligado a una carga útil a través de un resto que contiene 1,2,3-triazolileno, que se formó mediante una reacción de una carga útil ligada a alquino con el  $N_3$  del o los restos de aminoácidos y que comprende opcionalmente un resto de enlace entre el resto que contiene 1,2,3-triazolileno del polipéptido y la carga útil.

25 5. El conjugado de la reivindicación 4, en donde el resto de enlace comprende un enlace peptídico.

6. El conjugado de la reivindicación 4, en donde el resto de enlace comprende polietilenglicol (PEG).

7. El conjugado de la reivindicación 4, en donde la carga útil comprende un compuesto citotóxico.

30 8. El conjugado de la reivindicación 4, en donde la carga útil comprende un maitansinoide.

9. El conjugado de la reivindicación 4, en donde la carga útil comprende un hidrato de carbono.

35 10. El conjugado de la reivindicación 4, en donde la carga útil comprende un marcador.

11. Un anticuerpo que comprende uno o más restos de aminoácidos del compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

12. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde el polipéptido es un anticuerpo.

40 13. Un ARNt ortogonal aminoacilado con uno o más restos de aminoácidos del compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

45 14. Un método de producción de un polipéptido, que comprende poner en contacto un primer polipéptido con el ARNt ortogonal de la reivindicación 13 en condiciones adecuadas para incorporar el o los restos de aminoácidos en el polipéptido.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el ARNt ortogonal forma pares de bases con un codón que normalmente no está asociado a un aminoácido.

50 16. El método de la reivindicación 14, en donde el contacto se produce en una mezcla de reacción que comprende

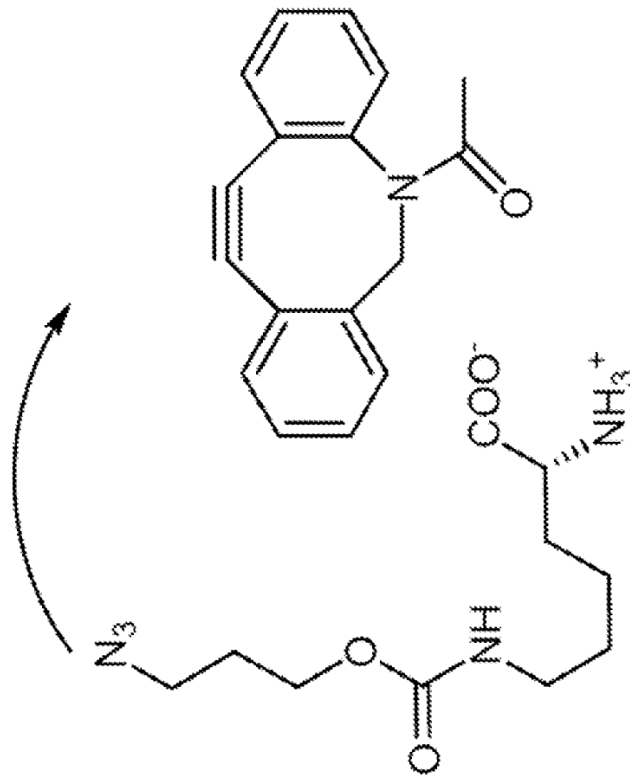
una ARNt sintetasa que aminoacila el ARNt ortogonal con el compuesto de las reivindicaciones 1 o 2.

5 17. Un método de producción de un conjugado, que comprende poner en contacto una carga útil ligada a alquino, que comprende opcionalmente un resto de enlace entre el alquino y la carga útil, con el polipéptido producido por la reivindicación 14.

18. El método de la reivindicación 17, donde la carga útil es un compuesto citotóxico.

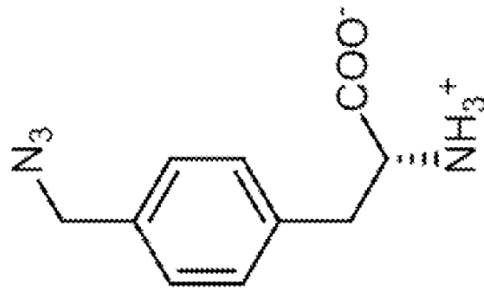
10 19. El método de la reivindicación 17, donde la carga útil es un hidrato de carbono.

20. Un conjugado producido por el método de la reivindicación 17.

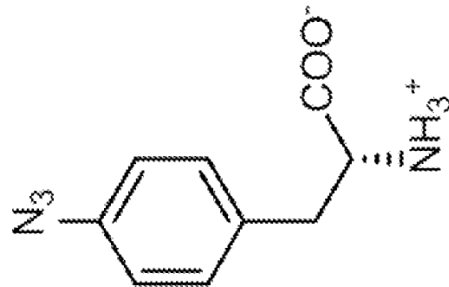


Compuesto (60)

Compuesto (40)



Compuesto (30)



Compuesto (50)

**Figura 1**

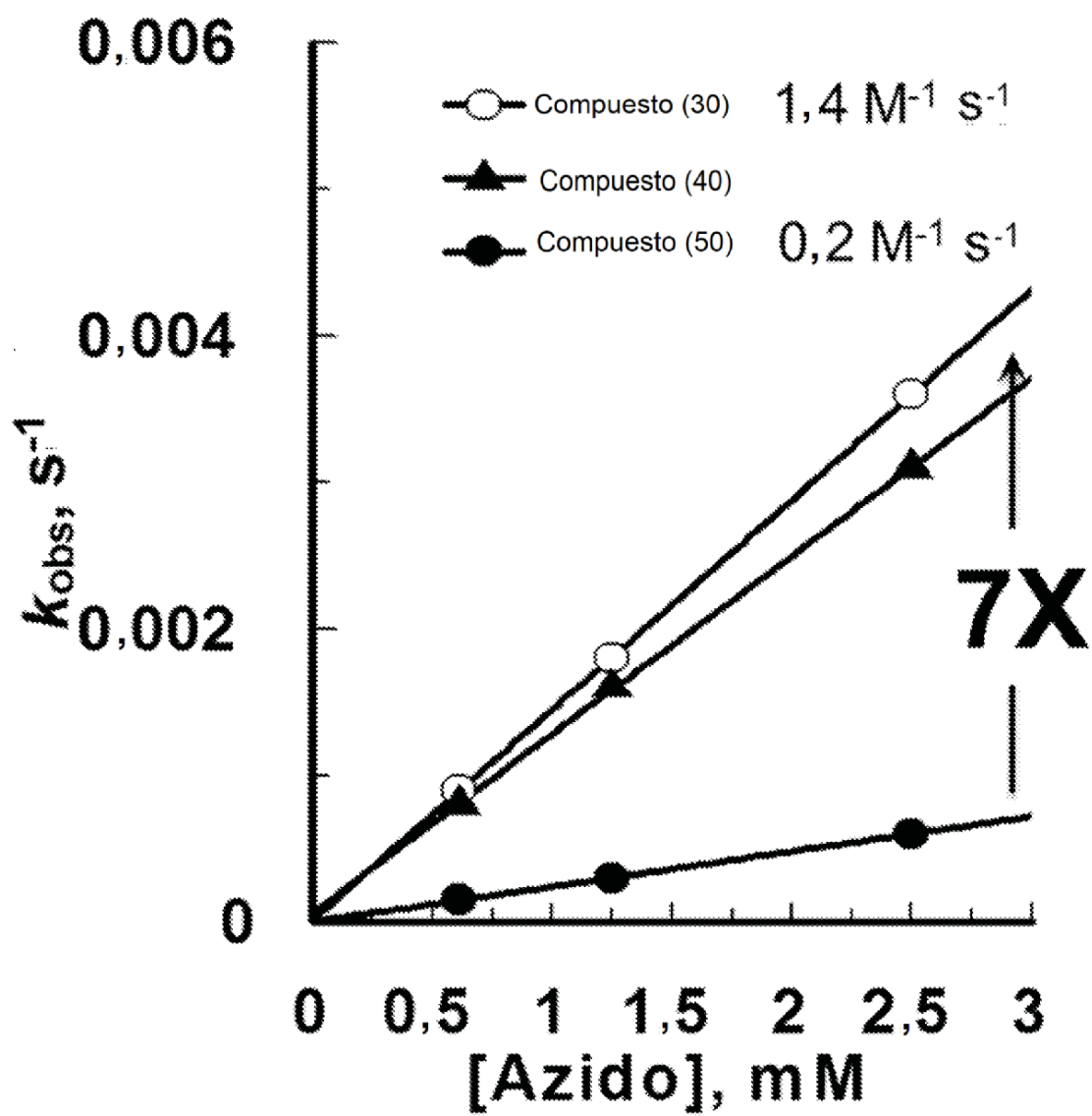


Figura 2

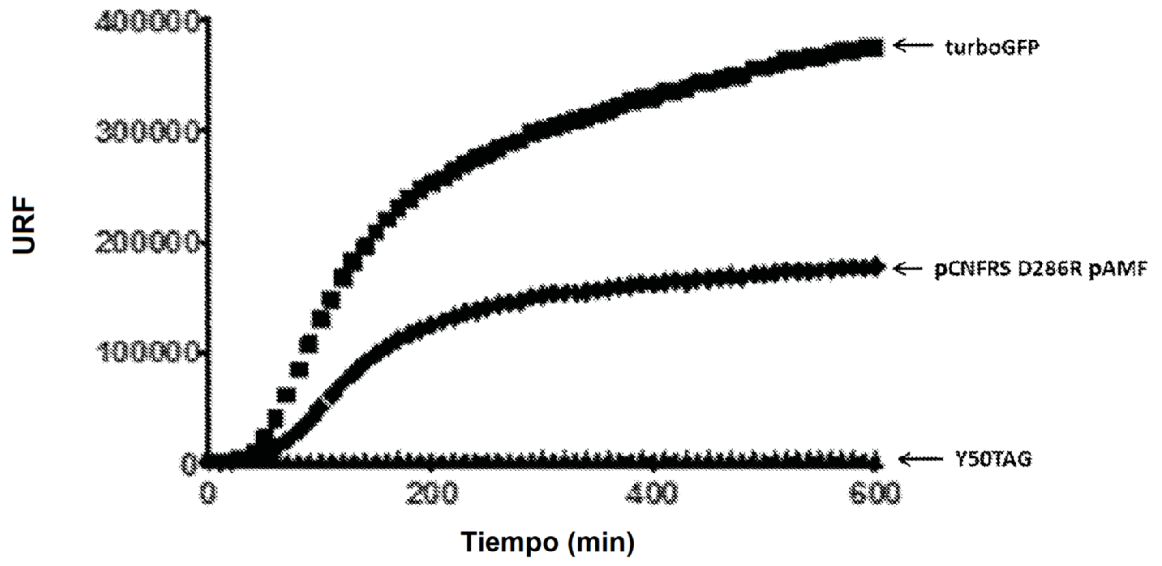


Figura 3

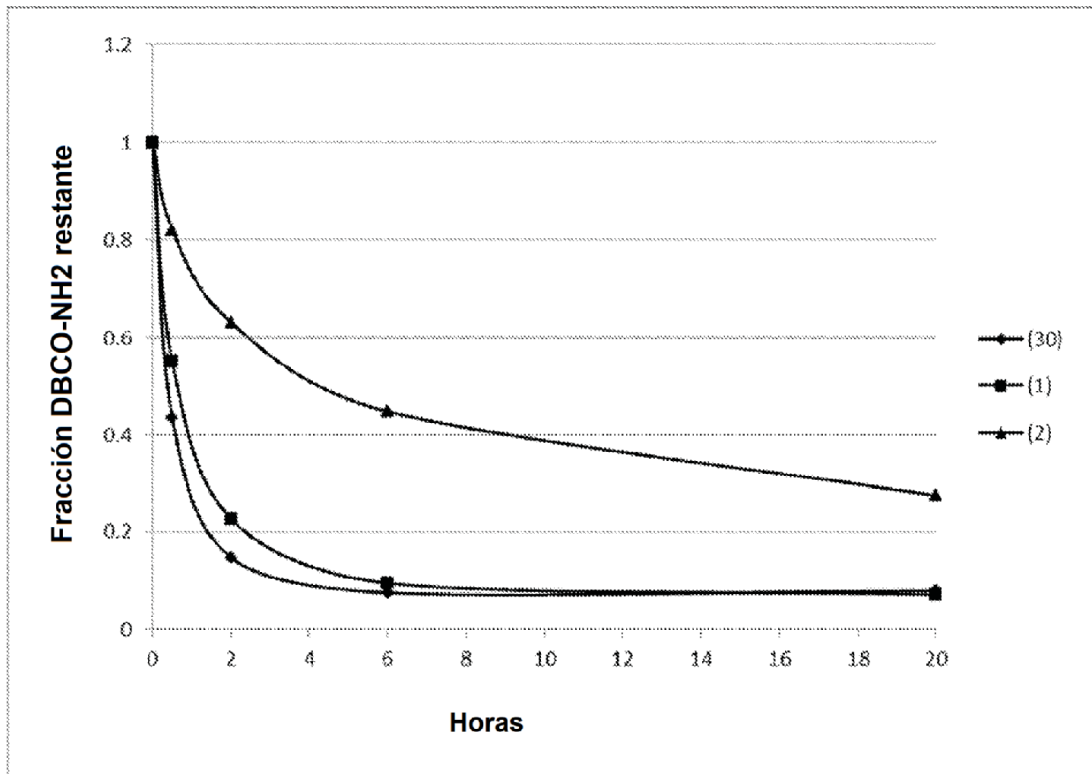


Figura 4