(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 948 496**

(51) Int. CI.:

C07C 323/55 (2006.01)
C07C 229/32 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2018 PCT/EP2018/069726**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019 WO19016354**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2018 E 18752099 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2023 EP 3655390**

(54) Título: **Nuevos aminoácidos que tienen un resto de norborneno**

(30) Prioridad:

20.07.2017 EP 17182393

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2023

(73) Titular/es:

VALANX BIOTECH GMBH (100.0%)
Plöcking 1 / IST Park
3400 Klosterneuburg, AT

(72) Inventor/es:

LUKESCH, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Nuevos aminoácidos que tienen un resto de norborneno

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos aminoácidos que tienen un resto de norborneno, a un proceso para la preparación enzimática de los mismos y al uso de los nuevos compuestos en química clic o modificación de proteínas específicas del sitio.

Antecedentes de la técnica

La modificación selectiva de moléculas biológicas es una opción en el desarrollo de fármacos modernos. Los beta-hidroxi aminoácidos que llevan un grupo reactivo norborneno son notablemente útiles como bloques de construcción en la química de péptidos y proteínas, así como para sintones para ingredientes farmacéuticos activos.

Los enfoques actuales para producir aminoácidos con dicha funcionalidad utilizan múltiples etapas sintéticas en disolventes orgánicos con laboriosos procedimientos de elaboración posteriores (Lang et al., 2013).

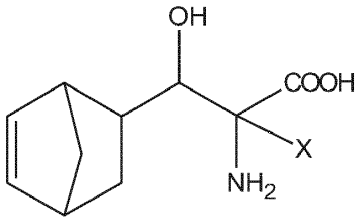
El documento de Patente WO2013/108044 describe polipéptidos que comprenden un aminoácido que tiene un grupo norborneno. Específicamente, *N*ε-5-norbornen-2-iloxicarbonil-L-lisina se incorpora genéticamente mediante el uso de un par ortogonal de tRNA sintetasa/tRNA.

Todavía existe la necesidad de nuevos aminoácidos que tengan un grupo norborneno que pueda reaccionar con diversos grupos químicos. Específicamente de nuevos aminoácidos que reaccionan con velocidades muy rápidas a pH fisiológico en condiciones acuosas y a temperatura ambiente.

Compendio de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos aminoácidos que tengan un grupo norborneno. El objetivo se soluciona mediante el tema en cuestión de la presente invención.

La presente invención se refiere a nuevos aminoácidos que tienen un grupo norborneno, a los métodos para producir dichos nuevos aminoácidos y a su uso. Una realización de la invención se refiere a compuestos de fórmula general I,

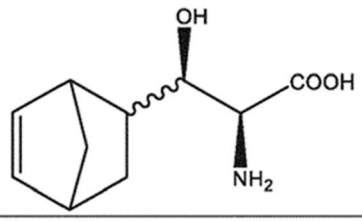
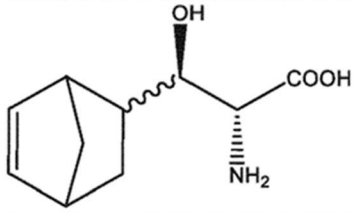
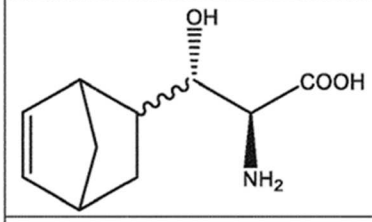
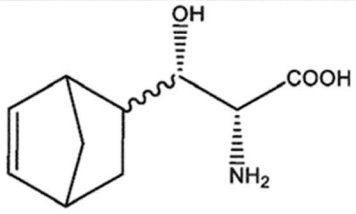
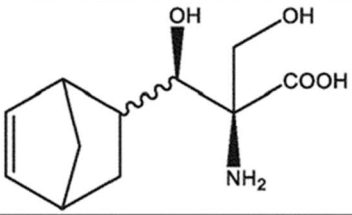
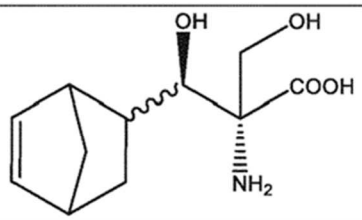
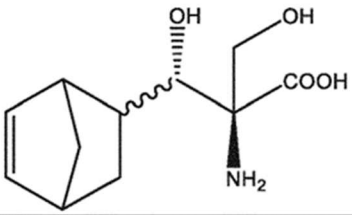
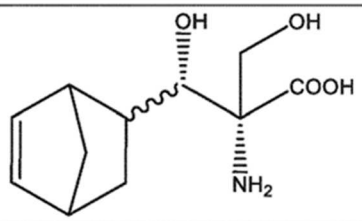


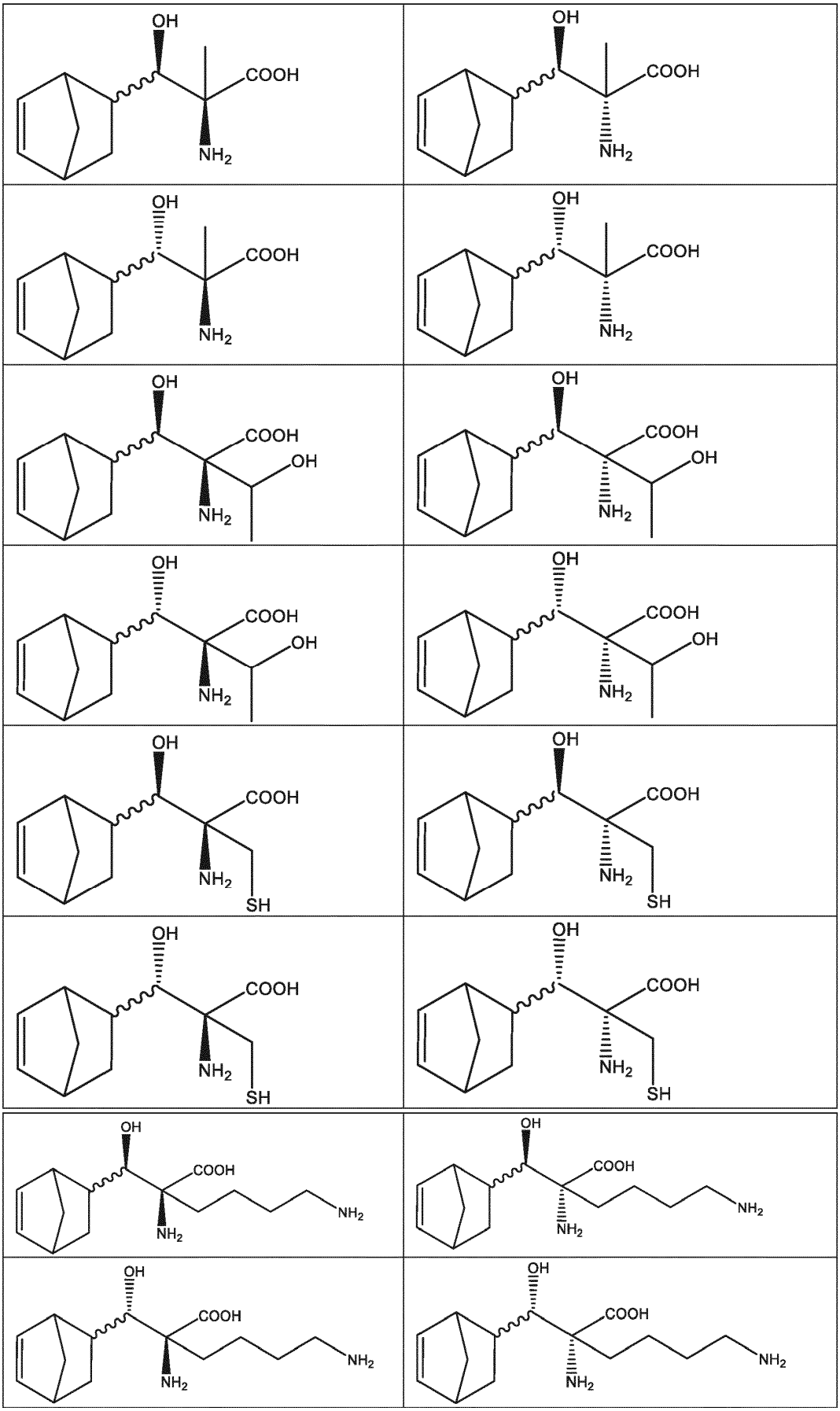
en donde X es un H o un alquilo de C_1-C_6, opcionalmente sustituido con hidroxi, halógeno, amina, tiol o carboxi.

Una realización adicional de la invención se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en D- o L-3-norbornen serina, D- o L-2-metil alcohol-3-norbornen serina, D- o L-2-metil-3-norbornen serina, D- o L-2-isopropil alcohol-3-norbornen serina, D- o L-2-metil tiol-3-norbornen serina, D- o L-2-butanamina-3-norbornen serina, D- o L-2-isopentan-3-norbornen serina, D- o L-2-ácido butírico-3-norbornen serina, D- o L-2-metilpirrolidin-3-norbornen serina, D- o L-2-metil(propil)sulfan-3-norbornen serina, D- o L-2-1-butilguanidin-3-norbornen serina, L-2-propionamida-3-norbornen serina y L-2-butiramida-3-norbornen serina.

Una realización de la invención se refiere al compuesto seleccionado de la Tabla 1.

Tabla 1


OH
COOH
NH2
SH

Una realización adicional de la invención se refiere a un método para producir compuestos como se describe en la presente memoria. El método comprende la etapa de hacer reaccionar norbornen-2-carboxaldehído con un aminoácido en presencia de treonina aldolasa.

Una realización de la invención se refiere al método como se describe en la presente memoria, en el que el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, isoleucina, leucina, treonina, ácido glutámico, prolina, metionina, arginina, asparagina, glutamina, lisina y cisteína.

Una realización de la invención se refiere al método como se describe en la presente memoria, en el que la treonina aldolasa es de origen eucariótico o procariótico, preferiblemente de origen bacteriano, de levadura o fúngico.

Una realización adicional de la invención se refiere al método como se describe en la presente memoria, en el que la treonina aldolasa es de *Pseudomonas, Sphingomonas, Azorhizobium, Methylobacterium, Escherichia, Thermotoga, Silicibacter, Paracoccus, Bordetella, Colwellia, Saccharomyces,* preferiblemente de *Pseudomonas putida.*

Una realización adicional de la invención se refiere al método como se describe en la presente memoria, en el que la treonina aldolasa está comprendida como lisado celular.

Una realización adicional de la invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos un aminoácido de fórmula general I.

Una realización adicional de la invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho aminoácido que tiene un grupo norborneno se incorpora en una posición correspondiente al resto de aminoácido en el polipéptido de tipo nativo.

Una realización de la invención se refiere a un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que dicho grupo norborneno se une a un grupo tetrazina o azida.

Una realización de la invención se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende un grupo norborneno, que comprende proporcionar un polipéptido como se describe en la presente memoria, poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto de tetrazina o azida e incubar para permitir la unión de la tetrazina o azida al grupo norborneno mediante una reacción de cicloadición.

Una realización de la invención se refiere a un método para producir un polipéptido como se describe en la presente memoria, en el que el compuesto de fórmula general I se incorpora genéticamente en un polipéptido o a través de la síntesis de péptidos.

Una realización adicional de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general I como bloque de construcción en química o como sintón para ingredientes farmacéuticos.

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 representa el vector de expresión. El gen de la treonina aldolasa está bajo el control de un promotor de arabinosa inducible. El vector se mantiene en la célula huésped mediante un origen de replicación p15a. La resistencia a la kanamicina es conferida por la expresión constitutiva del gen kan.

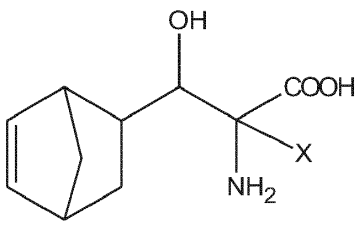
La Figura 2 muestra los resultados del experimento de cribado de co-disolventes.

La Figura 3 muestra una variante de eGFP que lleva Norl modificado con tetrazina TAMRA eliminada mediante secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem.

Descripción de realizaciones

La presente invención se refiere a nuevos β-hidroxi aminoácidos que llevan un resto norborneno en el carbono beta. Estos compuestos β-hidroxi aminoácidos nuevos pueden reaccionar con varios grupos, por ejemplo, tetrazinas, azidas, en reacciones químicas clic a velocidades muy rápidas a pH fisiológico en condiciones acuosas a temperatura ambiente.

Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a nuevos compuestos *β* -hidroxi aminoácidos de fórmula general I,



en donde X es H o alquilo de C_1-C_6, opcionalmente sustituido con hidroxi, halógeno, amina, tiol o carboxi.

Los nuevos compuestos se obtienen por una ruta sintética o por síntesis biocatalítica. Las L- y D-treonina aldolasas se han empleado en la síntesis de *β*-hidroxi-α-aminoácido usando benzaldehído y glicina. Sin embargo, se sabe que las aldolasas son flexibles para el aceptor pero rígidas para el sustrato donante. Aunque aceptan glicina, no aceptan D- y L-alanina, DL-leucina, éster etílico de glicina, amida de glicina y etanolamina junto con benzaldehído o acetaldehído (Steinreiber et al., 2007).

Sorprendentemente, el inventor descubrió que las L- y D-treonina aldolasas aceptan D- y L-alanina, D- y L-serina, y D- y L-lisina como donantes de aminoácidos y norbornen-2-carboxaldehído como aceptor de aldehídos. .

Por lo tanto, una realización adicional de la invención se refiere a un método para producir nuevos compuestos *β* -hidroxiaminoácidos, en los que se hace reaccionar norbornen-2-carboxaldehído con un aminoácido en presencia de treonina aldolasa.

El término "treonina aldolasa", como se usa en la presente memoria, se refiere a una enzima que tiene actividad de treonina aldolasa, que pertenece al grupo de carbono-carbono liasas dependientes de aldehído (EC 4.1.2), y que pertenece preferiblemente a las clases de clasificación de enzimas de EC 4.1.2.5 o EC 4.1.2.25. La actividad de treonina aldolasa se define como la capacidad de catalizar la división reversible de un *β* -hidroxi-*α*-aminoácido en glicina y el aldehído correspondiente. Las treonina aldolasas a veces también se denominan como fenilserina aldolasas o *β* -hidroxi aspartato aldolasas. Las treonina aldolasas son enzimas prácticamente ubicuas y pueden encontrarse, por ejemplo, en bacterias, arqueas, levaduras y hongos, incluyendo, por ejemplo, *Pseudomonas, Escherichia, Aeromonas, Thermotoga, Silicibacter, Paracoccus, Bordetella, Colwellia* y *Saccharomyces.* Específicamente, la enzima es de la forma *P. putida, P. aeruginosa, P. fluorescence, E. coli, A. jandaei, T. maritima, Silicibacter pomeroyi, P. denitrificans, B. parapertussis, B. bronchiseptica, C. psychrerythreae,* y *S. cerevisiae.* Preferiblemente, la treonina aldolasa es de una especie *Pseudomonas* , tal como, por ejemplo, *P. putida, P. fluorescence* o *P. aeruginosa* . El experto en la materia sabe cómo encontrar treonina aldolasas que sean adecuadas para la conversión de aminoácidos y el norbornen-2-carboxaldehído específico. Preferiblemente, se usa una treonina aldolasa de *P. putida*.

La treonina aldolasa empleada en un método según la invención puede ser una enzima de tipo nativo o una enzima manipulada genéticamente.

Por ejemplo, la treonina aldolasa puede estar presente, por ejemplo, en forma de dispersión, emulsión, solución o en forma inmovilizada, como enzima cruda, como una enzima disponible comercialmente, como una enzima purificada adicionalmente a partir de una preparación disponible comercialmente. La treonina aldolasa se puede obtener de su fuente mediante una combinación de métodos de purificación conocidos, en células enteras (opcionalmente permeabilizadas y/o inmovilizadas) que de origen natural o mediante modificación genética poseen treonina aldolasa, o en un lisado de células con dicha actividad. La expresión de treonina aldolasa en la célula completa puede potenciarse usando métodos conocidos por los expertos. Quedará claro para el experto en la materia que también se puede hacer uso de mutantes de enzimas de origen natural (de tipo nativo) con treonina aldolasa en el proceso según la invención. Los mutantes de las enzimas de tipo nativo se pueden hacer, por ejemplo, modificando el DNA que codifica las enzimas de tipo nativo usando técnicas de mutagénesis tales como, por ejemplo, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida, transposición de genes, proteínas de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión de treonina aldolasa y descarboxilasa; etc., de modo que el DNA codifique una enzima que difiera en al menos un aminoácido de la enzima de tipo nativo y efectúe la expresión del DNA así modificado en una célula (huésped) adecuada. Los mutantes de la treonina aldolasa pueden tener propiedades mejoradas, por ejemplo con respecto a la selectividad por el sustrato y/o la actividad y/o la estabilidad y/o la resistencia a los disolventes y/o el perfil de pH y/o el perfil de temperatura. También, o alternativamente, el DNA que codifica la enzima de tipo nativo puede modificarse para potenciar la expresión de la misma.

Se entiende que el término "treonina aldolasa enantioselectiva" se refiere a una enzima que prefiere uno de los enantiómeros del intermedio de β-hidroxi-α-aminoácido correspondiente al aldehído utilizado, es decir, una treonina aldolasa que tiene enantioselectividad para la configuración L- o D- del carbono en la posición α con respecto al grupo ácido carboxílico (el carbono con un grupo amino unido). Por ejemplo, los expertos saben que treonina aldolasas son selectivas para la configuración L del carbono α con respecto al grupo ácido carboxílico, así como que treonina aldolasas son selectivas para su configuración D.

La enantioselectividad de la treonina aldolasa es de al menos 90 %, preferiblemente de al menos 95 %, más preferiblemente de al menos 98 % o lo más particularmente de al menos 99 %.

Como se usa en la presente memoria, el término con una enantioselectividad del 90 % significa que el aminoácido y el aldehído correspondiente se convierten en un 90 % en uno de los enantiómeros del intermedio de β-hidroxi-α-aminoácido y en un 10 % en el otro enantiómero del correspondiente β-hidroxi-α-aminoácido. El exceso diastereomérico (d.e.) del estereoisómero formado preferiblemente será entonces del 80%.

Las condiciones de reacción elegidas dependen de la elección de la enzima. El experto en la materia sabe cómo optimizar varios parámetros tales como temperatura, pH, concentración, uso de disolvente, etc. La temperatura y el pH no son muy críticos en el proceso de la invención. Preferiblemente, sin embargo, el proceso se lleva a cabo a un pH entre 4 y 10. En particular, la conversión se lleva a cabo a un pH entre 4,5 y 8,0, o a un pH entre 6,0 y 7,5. La

temperatura se elige preferiblemente entre 0 y 80°C. Preferiblemente, la temperatura está entre 5°C y 50°C, o entre 10°C y 40°C, o entre 25 y 37°C.

Los disolventes adecuados para el proceso de la invención incluyen, por ejemplo, agua, mezclas monofásicas de agua y un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo, alcoholes miscibles con agua, por ejemplo, metanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, acetonitrilo; o mezclas bifásicas de agua y un disolvente orgánico no miscible, por ejemplo, hidrocarburos, éteres, etc., o los llamados líquidos iónicos, tal como, por ejemplo, sales de 1,3-dialquilimidazolio o sales de *N*-alquilpiridinio de ácidos como el ácido hexafluorofosfórico, el ácido tetrafluorobórico o el ácido trifluorometanosulfónico, o con $(CF_3SO_2)_2N^-$ como equivalente aniónico. Preferiblemente, en el proceso de la invención se utiliza una mezcla monofásica de agua y dimetilsulfóxido (DMSO), por ejemplo agua con un contenido de DMSO entre 1 y 50% v/v, o entre 5 y 30% v/v, o entre 10 y 20 % v/v.

Además, es posible realizar el proceso de la presente invención en un sistema de emulsión, tal como macro o microemulsiones, sistemas bicontinuos que comprenden una fase orgánica (con el sustrato de norbornen carboxaldehído), una fase acuosa (generalmente con el aminoácido y la treonina aldolasa) y un tensioactivo adecuado (no iónico, catiónico o aniónico), o similares.

En principio, la relación molar entre el aminoácido o una sal del mismo y el norbornen carboxaldehído no es crítica. La relación molar entre el aminoácido o una sal del mismo y el norbornen carboxaldehído es > 1 y puede ser, por ejemplo, 1000:1, 100:1 o 10:1.

El orden de adición de los reactivos, aminoácido o una sal del mismo, el norbornen carboxaldehído; y la enzima treonina aldolasa en principio no es crítico. Por ejemplo, el proceso se puede realizar por lotes (es decir, se añade todo a la vez) o en un modo de alimentación por lotes (por lo general, es decir, alimentando uno o ambos reactivos; sin embargo, también se pueden alimentar enzimas). Puede ser ventajoso eliminar el β-hidroxi aminoácido formado durante la reacción y/o reciclar la treonina aldolasa. Esto se puede hacer en lotes, pero por supuesto también se puede hacer de forma continua.

Puede ser ventajoso añadir cofactores a la reacción para mejorar la actividad enzimática de la treonina aldolasa. Los expertos conocen ejemplos de cofactores e incluyen piridoxal-5-fosfato, coenzima B12, dinucleótido de flavina y adenina, fosfopanteteína, tiamina, S-adenosilmetionina, biotina, sales de, por ejemplo, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^+, K^+ y Cl^-. La selección del cofactor depende de la selección de la enzima, por ejemplo, la actividad enzimática de treonina aldolasa de *P. putida* puede mejorarse mediante la adición de piridoxal-5-fosfato. Por ejemplo, se puede añadir al proceso piridoxal-5-fosfato en una concentración entre 0,001 y 10 mM, o entre 0,01 y 1 mM, o entre 0,1 y 0,5 mM.

Las cantidades óptimas de la treonina aldolasa dependen del sustrato aldehído utilizado y el experto en la materia puede determinarlas fácilmente mediante experimentación rutinaria. El aminoácido o una sal del mismo puede usarse en una concentración entre 0,1 y 4 M, o entre 0,5 y 3 M, o entre 1,0 y 2,5 M.

El norbornen-carboxaldehído se puede utilizar en una concentración entre 1 y 1000 mM, o entre 10 y 500 mM, o entre 20 y 100 mM.

Una realización adicional de la invención se refiere a un polipéptido que comprende un solo aminoácido que tiene un grupo norborneno. Tener un solo aminoácido que lleva un grupo norborneno proporciona un producto polipeptídico definido con precisión. Tener un solo aminoácido que tenga un grupo norborneno evita problemas de etiquetado múltiple o etiquetado incompleto (si una reacción no se completa, pueden resultar productos heterogéneos, lo que puede ser un problema que se soluciona de manera útil teniendo un solo aminoácido que tenga un grupo norborneno). En algunas realizaciones, dicho grupo norborneno está presente como un resto de aminoácido de una norbornen glicina, norbornen alanina, norbornen serina, norbornen isoleucina, norbornen leucina, norbornen treonina, norbornen ácido glutámico, norbornen prolina, norbornen metionina, norbornen arginina, norbornen asparagina, norbornen glutamina, norbornen lisina y norbornen cisteína. Algunas realizaciones de la invención se refieren al grupo norborneno presente como un resto de aminoácido de norbornen glicina, norbornen alanina, norbornen serina o norbornen lisina. En realizaciones preferidas, dicho aminoácido único no es un aminoácido N-terminal. Preferiblemente, el grupo amino N-terminal no comprende norborneno. Una realización adicional de la invención se refiere a un polipéptido en el que el resto de aminoácido que lleva el norborneno es un aminoácido interno del polipéptido.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para producir un polipéptido que comprende un grupo norborneno, comprendiendo dichos métodos incorporar genéticamente un aminoácido que comprende un grupo norborneno en un polipéptido. La incorporación genética del grupo norborneno permite la construcción precisa de un polipéptido definido. La localización del grupo norborneno se puede controlar con precisión. Esto evita de manera ventajosa la necesidad de someter el polipéptido completo a etapas de reacción complejas para la adición del grupo norborneno.

Convenientemente, el método descrito para producir el polipéptido comprende

(i) proporcionar un ácido nucleico que codifica el polipéptido cuyo ácido nucleico comprende un codón ortogonal que codifica el aminoácido que tiene un grupo norborneno;

(ii) traducir dicho ácido nucleico en presencia de un par ortogonal de tRNA sintetasa/tRNA capaz de reconocer dicho codón ortogonal e incorporar dicho aminoácido que tiene un grupo norborneno en la cadena polipeptídica. Convenientemente dicho codón ortogonal comprende un codón ámbar (TAG), dicho tRNA comprende *MBT*RNAcuA y dicha tRNA sintetasa comprende *Mb*PyIRS.

Adecuadamente dicho aminoácido que comprende un grupo norborneno es norbornen glicina, norbornen alanina, norbornen serina, norbornen isoleucina, norbornen leucina, norbornen treonina, norbornen ácido glutámico, norbornen prolina, norbornen metionina, norbornen arginina, norbornen asparagina, norbornen glutamina, norbornen lisina y norbornen cisteína. Algunas realizaciones de la invención se refieren al grupo norborneno presente como un resto de aminoácido de norbornen glicina, norbornen alanina, norbornen serina o norbornen lisina.

Adecuadamente, dichos aminoácidos se listaron anteriormente en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un único grupo norborneno. Esto tiene la ventaja de mantener la especificidad para cualquier modificación química adicional que pueda estar dirigida al grupo norborneno. Por ejemplo, cuando solo hay un único grupo norborneno en el polipéptido de interés, entonces pueden surgir problemas de modificación parcial (por ejemplo, cuando solo se modifica un subconjunto de grupos norborneno en el polipéptido) o problemas de microambientes de reacción que varían entre grupos norborneno alternos en el mismo polipéptido (que podrían conducir a una reactividad desigual entre diferentes grupos norborneno en diferentes localizaciones en el polipéptido). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido comprende un solo resto de aminoácido de norborneno.

Una ventaja clave de la incorporación del grupo norborneno es que permite que una variedad de compuestos adicionales extremadamente útiles, tales como marcadores, se unan fácil y específicamente al grupo norborneno.

Una realización adicional de la invención se refiere a dicho grupo norborneno que está unido a un grupo tetrazina o azida. El grupo tetrazina o azida puede unirse además a un fluoróforo o a un grupo PEG o a una sustancia farmacéuticamente activa.

El fluoróforo se puede seleccionar del grupo que consiste en fluoresceína, tetrametil rodamina (TAMRA) o boro-dipirrometeno (BODIPY).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende un grupo norborneno, comprendiendo dicho método proporcionar un polipéptido que comprende un grupo norborneno como se describió anteriormente, poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto de tetrazina o azida e incubar la mezcla para permitir la unión de la tetrazina o azida al grupo norborneno mediante una reacción de cicloadición. Dicha reacción de cicloadición puede ser, por ejemplo, una reacción de cicloadición de Diels-Alder de demanda inversa de electrones.

Esta química tiene la ventaja de la velocidad de reacción. Por lo tanto, se permite que dicha reacción prosiga adecuadamente durante 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 9 h, 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 2 h, o incluso menos. En algunas realizaciones de la invención, se permite que dicha reacción prosiga durante 30 minutos o incluso menos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de PEGilación de un polipéptido que comprende llevar a cabo el método descrito anteriormente, en el que dicho compuesto de tetrazina o azida se une a un grupo PEG. Se observará que ciertos entornos de reacción pueden afectar a los tiempos de reacción. Los tiempos más cortos, tal como 2 h, 30 min o menos, se aplican a reacciones *in vitro*.

Las reacciones *in vivo,* o en condiciones de cultivo eucariótico, tal como medio de cultivo tisular u otro medio adecuado para células eucarióticas, puede ser necesario realizarlas durante más de 30 minutos o más de 2 horas para lograr el marcado deseado.

También se describen en la presente memoria métodos para producir polipéptidos que comprenden un grupo norborneno, comprendiendo dicho método modificar un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido para proporcionar un codón ámbar en una o más posiciones correspondientes a las posiciones en dicho polipéptido donde se desea incorporar un grupo norborneno. Las modificaciones adecuadas de dicho ácido nucleico comprenden mutar cualquier codón a un codón ámbar (TAG).

El direccionamiento (*es decir,* la sustitución con un aminoácido no natural, por ejemplo, a través de supresión ámbar) se hace adecuadamente para que la posición elegida sea accesible para el fluoróforo de tetrazina o azida, *es decir,* se encuentre en la superficie de la proteína plegada. Por lo tanto, los aminoácidos polares en las secuencias de tipo nativo originales son posiciones especialmente adecuadas para ser dirigidas.

En principio, la invención se puede aplicar a cualquier posición en el polipéptido. Adecuadamente, la invención no se aplica al aminoácido N-terminal del polipéptido. Cuando se selecciona la posición del aminoácido al que se dirige en el polipéptido de interés, es ventajoso seleccionar un resto superficial. Los restos superficiales pueden determinarse mediante análisis de secuencias o mediante modelado molecular tridimensional. Los restos superficiales pueden determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Las ventajas del direccionamiento a los restos superficiales incluyen una mejor presentación de colorantes tal como fluoróforos o etiquetas tales como etiquetas biofísicas. Las ventajas del direccionamiento a los restos superficiales incluyen modificaciones posteriores

más simples o más eficientes. Las ventajas del direccionamiento a los restos superficiales incluyen una menor probabilidad de alteración de la estructura y/o función del polipéptido mediante la aplicación del marcador.

Los restos de aminoácidos particularmente adecuados para dirigir en el polipéptido de interés incluyen restos no hidrofóbicos. Los restos hidrofóbicos adecuados no son el objetivo según la invención. Los restos hidrofílicos adecuados son el objetivo. Los restos adecuadamente polares están dirigidos. Adecuadamente, se dirigen a glicina, alanina, serina, isoleucina, leucina, treonina, ácido glutámico, prolina, metionina, arginina, asparagina, glutamina, lisina o cisteína. Adecuadamente, se dirigen a glicina, alanina, serina o lisina. "Dirigido", tal y como se usa en la presente memoria, significa sustituir el codón por el resto al que se dirige el codón ortogonal y sintetizar el polipéptido como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido recombinante homogéneo como se describe anteriormente. Adecuadamente, dicho polipéptido se prepara mediante un método como el descrito anteriormente.

Una realización adicional de la invención se refiere a un polipéptido producido según los métodos descritos en la presente memoria. Además de ser el producto de esos nuevos métodos, dicho polipéptido tiene la característica técnica ventajosa de comprender un grupo norborneno.

Mutar tiene su significado normal en la técnica y puede referirse a la sustitución, o truncamiento o eliminación del resto, motivo o dominio al que se hace referencia. La mutación puede efectuarse a nivel de polipéptido, por ejemplo, mediante la síntesis de un polipéptido que tenga la secuencia mutada, o puede efectuarse a nivel de nucleótido, por ejemplo, preparando un ácido nucleico que codifica la secuencia mutada, cuyo ácido nucleico puede traducirse posteriormente para producir el polipéptido mutado. Cuando no se especifica ningún aminoácido como aminoácido de reemplazo para un sitio de mutación dado, se puede usar adecuadamente una aleatorización de dicho sitio.

Un fragmento tiene al menos 10 aminoácidos de longitud, o al menos 25 aminoácidos, o al menos 50 aminoácidos, o al menos 100 aminoácidos, o al menos 200 aminoácidos, o al menos 250 aminoácidos, o al menos 300 aminoácidos, o al menos 313 aminoácidos, o la mayoría del polipéptido de interés.

En el método según la invención, dicha incorporación genética utiliza preferiblemente un código genético ortogonal o expandido, en el que se han asignado uno o más codones ortogonales específicos para codificar el resto de aminoácido específico con el grupo norborneno para que pueda incorporarse genéticamente mediante el uso de un par ortogonal de tRNA sintetasa/tRNA. El par ortogonal de tRNA sintetasa/tRNA puede ser, en principio, cualquier par capaz de cargar el tRNA con el aminoácido que comprende el grupo norborneno y capaz de incorporar esos aminoácidos que comprenden el grupo norborneno en la cadena polipeptídica en respuesta al codón ortogonal. El codón ortogonal puede ser el codón ortogonal ámbar, ocre, ópalo o un codón cuádruple o cualquier otro codón triplete. El codón simplemente tiene que corresponder al tRNA ortogonal que se utilizará para transportar el aminoácido que comprende el grupo norborneno. Preferiblemente, el codón ortogonal es ámbar.

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de interés para el método descrito en la presente memoria pueden incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por tanto, en una realización adicional, la invención proporciona un método para preparar polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido según la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y haciendo crecer la célula huésped en condiciones que permitan la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli* así como levaduras tales como *S. cerevisiae* y *P. pastoris* así como células huésped eucariotas superiores como células de insecto, células HEK y células de ovario de hámster chino.

Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector se une de manera operativa a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por parte de la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término “conectado operativamente” significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia reguladora ”unido operativamente” a una secuencia codificante se une de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. Los vectores de la invención pueden transformarse o transfectarse en una célula huésped adecuada como se describe para proporcionar la expresión de una proteína de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión como se describe anteriormente en condiciones para proporcionar la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica la proteína y, opcionalmente, recuperar la proteína expresada.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos o virales proporcionados con un origen de replicación, opcionalmente un promotor de la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano. Los vectores se pueden usar, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula huésped.

Las secuencias de control ligadas operativamente a las secuencias que codifican la proteína de la invención incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control se pueden seleccionar para que sean compatibles con la célula huésped para la que se diseñó el vector de expresión. El término

promotor es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico que varían en tamaño y complejidad desde promotores mínimos hasta promotores elementos anteriores y potenciadores.

Otro aspecto de la invención es un método, tal como un método *in vivo* , para incorporar el(los) aminoácido(s) que contiene(n) norborneno genéticamente y específicamente en el sitio en la proteína de elección, adecuadamente en una célula bacteriana o eucariota. Una ventaja de la incorporación de manera genética mediante dicho método es que evita la necesidad de suministrar las proteínas que comprenden el aminoácido con norborneno en una célula una vez formada, ya que en esta realización pueden sintetizarse directamente en la célula objetivo. El método comprende las siguientes etapas:

i) introducir o reemplazar un codón específico con un codón ortogonal tal como un codón ámbar en el sitio deseado en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína;

ii) introducir un sistema de expresión de un par ortogonal de tRNA sintetasa/tRNA en la célula, tal como un par pirolisil-tRNA sintetasa/RNA;

iii) hacer crecer las células en un medio con el aminoácido que contiene norborneno según la invención.

La etapa (i) implica o reemplaza un codón específico con un codón ortogonal tal como un codón ámbar en el sitio deseado en la secuencia genética de la proteína. Esto se puede lograr simplemente introduciendo un constructo, tal como un plásmido, con la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, en donde el sitio donde se desea introducir/reemplazar el aminoácido que contiene norborneno se modifica para comprender un codón ortogonal tal como un codón ámbar. Esto está dentro de la capacidad del experto en la materia y en la presente memoria se dan ejemplos de ello.

La etapa (ii) requiere un sistema de expresión ortogonal para incorporar específicamente el aminoácido que contiene norborneno en la localización deseada (por ejemplo, el codón ámbar). Por lo tanto, se requiere una tRNA sintetasa ortogonal específica tal como una pirolisil-tRNA sintetasa ortogonal y un par de tRNA ortogonal correspondiente específico que juntos son capaces de cargar dicho tRNA con el aminoácido que contiene norborneno. Ejemplos de estos se proporcionan en la presente memoria.

Las células huésped que comprenden polinucleótidos según la invención pueden usarse para expresar proteínas de la invención. Las células huésped pueden cultivarse en condiciones adecuadas que permitan la expresión de las proteínas de la invención. La expresión de las proteínas de la invención puede ser constitutiva de modo que se produzcan de manera continua, o inducible, requiriendo un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de expresión inducible, la producción de proteínas puede iniciarse cuando se requiera, por ejemplo, mediante la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo, dexametasona o IPTG.

Las proteínas de la invención se pueden extraer de las células huésped mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen lisis enzimática, química y/u osmótica y alteración física.

Las proteínas de la invención se pueden purificar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como cromatografía preparativa, purificación por afinidad o cualquier otra técnica adecuada.

Adecuadamente, el grupo norborneno incorporado en el polipéptido de interés se hace reaccionar con un compuesto de tetrazina o azida. La tetrazina o azida actúa para unir convenientemente una molécula de interés al polipéptido a través del norborneno. Por lo tanto, el compuesto de tetrazina o azida ya puede tener la molécula de interés.

Adecuadamente, dicho grupo tetrazina o azida se puede unir además a cualquier molécula de interés adecuada para unir la misma al polipéptido a través de la reacción norborneno-tetrazina o norborneno-azida.

Las tetrazinas se diseñan y sintetizan de manera que tengan un grupo amino primario de fácil acceso. Este grupo amino se puede hacer reaccionar con una variedad de compuestos utilizando reacciones de acoplamiento de amina estándar. Como las tetrazinas son estables en una amplia variedad de condiciones de reacción, casi cualquier compuesto puede acoplarse a la tetrazina de interés. Los compuestos ejemplares unidos a tetrazinas (para la unión al polipéptido a través del norborneno) incluyen varios fluoróforos como se menciona en la presente memoria. Las tetrazinas también pueden acoplarse a fluoróforos más sofisticados, por ejemplo, aquellos adecuados para Microscopía de Súper Resolución, como STORM, PALM o STED, (por ejemplo colorantes Alexa o colorantes especiales de Abberior, desarrollados para microscopía STED). Los lípidos pueden acoplarse a tetrazinas mediante técnicas estándar. Los PEGs pueden acoplarse a tetrazinas (véanse los ejemplos), que son beneficiosas para la PEGilación de polipéptidos a través del norborneno según la invención. En todos los casos, los beneficios clave de nuestro enfoque incluyen el hecho de que la incorporación de norborneno según la invención es específica del sitio y, lo que es más importante, puede realizarse *in vivo* (y/o *in vitro* en un organismo tal como *E. coli*). Por el contrario, en los enfoques de la técnica anterior, el anticuerpo o la proteína purificados solo pueden reaccionar *in vitro* con norborneno de una manera no selectiva y no específica del sitio que tiene numerosos problemas como se ha expuesto anteriormente. Por lo tanto, la invención proporciona beneficios significativos en comparación con los métodos de la técnica anterior, como se demuestra en la presente memoria.

El polipéptido que contiene norborneno de la invención se puede conjugar convenientemente con otras etiquetas biofísicas además de los fluoróforos, por ejemplo, sondas de NMR, sondas de etiqueta de espín, etiquetas de IR, sondas de EM, así como moléculas pequeñas, oligonucleótidos, lípidos, nanopartículas, puntos cuánticos, sondas biofísicas (etiquetas de EPR, etiquetas de NMR, etiquetas de IR), moléculas pequeñas (biotina, fármacos, lípidos), oligonucleótidos (DNA, RNA, LNA, PNA), partículas (nanopartículas, virus), polímeros (PEG, PVC), proteínas, péptidos, superficies y similares.

Los nuevos aminoácidos que contienen norborneno son específicamente útiles para su incorporación en polipéptidos o proteínas. Por tanto, se contempla la conjugación del polipéptido o la proteína a restos que llevan un resto de tetrazina o azida. Los polipéptidos o proteínas modificados pueden usarse como ingredientes farmacéuticos activos. Los nuevos compuestos de aminoácidos que tienen el resto norborneno pueden ser increíblemente útiles como bloques de construcción en la química de péptidos y como nuevos sintones para ingredientes farmacéuticos.

Los compuestos son específicamente útiles como bloque de construcción para la síntesis química o enzimática de polipéptidos, proteínas o análogos o precursores de los mismos. Se entiende que el término ”bloque de construcción” se refiere a unidades estructurales que se utilizan en operaciones químicas o enzimáticas.

En el contexto de la presente invención, el término “´sintón” se refiere a un compuesto que es, o puede usarse como, un equivalente sintético para un compuesto particular de interés en una reacción química, por ejemplo, en la síntesis de un ingrediente farmacéutico activo.

Ejemplos

Los Ejemplos que siguen se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no tienen la intención de limitar el alcance de la invención de ninguna manera, y no deben interpretarse como tal. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Métodos:

Las células de *E. coli* que albergan el gen de fenilserina/treonina aldolasa se cultivan y expresan fenilserina/treonina aldolasa. Después de la recolección, las células se rompen usando procedimientos de ruptura celular estándar. Los restos celulares se eliminan por centrifugación para dar un lisado celular claro. El lisado se tampona usando tampón de fosfato 50 mM a un pH en el intervalo de 6-9. El aminoácido y el aldehído (disueltos en un 20 % del volumen total de un co-disolvente orgánico (DMSO)) se añaden después al lisado y se hacen reaccionar a 30°C durante 24 h. El producto precipita durante el transcurso de la reacción y se recupera mediante ajuste de pH y centrifugación.

Incorporación de proteínas:

Una pirrolisil-tRNA sintetasa mutante, obtenida a partir de una pirrolisil-tRNA sintetasa de tipo nativo, que es pirrolisil-tRNA sintetasa derivada de metanosarcina, y/o la pirrolisil-tRNA sintetasa mutante aminoacila una tRNA de pirrolisina, incorpora aminoácidos como se describe en la presente memoria.

Creación de plásmidos:

El gen de la fenilserina/treonina aldolasa se amplificó utilizando DNA genómico de *Pseudomonas putida* kt2440 (DSM-6125) como plantilla. La plantilla se preparó mediante lisis celular simple con precipitación de DNA concomitante usando etanol. Los cebadores utilizados se muestran a continuación:

LTA directo: GCTAATTCATATGACAGACAAGAGCCAACAATTCGCCAGC

LTA inverso: TACGATTAAGCTTTTATTAGCCACCAATGATCGTGCGGATATC

La enzima se clonó en un vector de bajo número de copias usando enzimas de restricción (NdeI, HindIII) para estar bajo el control de un sistema de expresión inducible por L-arabinosa.

Expresión enzimática:

El plásmido que contenía L-TA1 se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) y los clones positivos se seleccionaron sembrando en una placa LB que contenía 50 µg/mL de kanamicina. Se recogió una única colonia y se inoculó en 15 mL de medio LB estéril que contenía kanamicina. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente, se inoculó 1 L de medio Terrific Broth que contenía glucosa 50 mM y kanamicina 50 µg/mL con 15 mL de cultivo de la noche. El cultivo se hizo crecer con agitación a 37ºC durante 4 h cuando se indujo la expresión de la enzima añadiendo L-arabinosa al 0,2%. Después de la inducción, el cultivo se transfirió con agitación a 30°C y se incubó durante la noche. Al día siguiente, el cultivo se recogió por centrifugación a 5000 g durante 30 min a 4°C. El sedimento celular se lavó con NaCl estéril al 0,9 % y se sedimentó de nuevo en las mismas condiciones. Los sedimentos celulares se congelaron a -20°C hasta su uso posterior.

Síntesis de aminoácidos:

Los sedimentos celulares de 500 mL de cultivo se descongelaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 30 mL de tampón de Na_2HPO_4 50 mM pH 8. La suspensión celular se lisó usando sonicación. Los desechos celulares se sedimentaron a 15000 g durante 30 min a 4°C. Para la síntesis de aminoácidos, el lisado se mezcló 1:7 con tampón de Na_2HPO_4 100 mM pH 7 que contiene 1 M del aminoácido respectivo, 20 % de DMSO y 300 mM de norborneno carboxaldehído. La mezcla de reacción se incuba durante 16 horas a 30°C. El precipitado blanco resultante se recoge por centrifugación a 8000 g durante 30 min y se seca por liofilización para obtener el aminoácido.

El aminoácido que lleva el norborneno se incorpora, por ejemplo, en la hormona del crecimiento humana, la hormona paratiroidea o las proteínas fluorescentes.

Selección de co-disolventes:

El lisado celular se preparó como se describe anteriormente. La selección de co-disolventes se realizó en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Los componentes se añadieron en el siguiente orden: tampón de Na_2HPO_4 50 mM (pH 8,0), co-disolvente, aldehído y lisado. La composición de la mezcla de reacción se resume en la Tabla 1. Se probaron 10 % y 20 % (v/v) de los siguientes co-disolventes: acetona, acetonitrilo, butan-1-ol, terc-butanol, 1,4-dioxano, DMSO, etanol, acetato de etilo, etilenglicol, glicerol, THF y tolueno.

Tabla 2- Composición de la mezcla de reacción para la selección de co-disolventes

	cantidad [µL]			
	norborneno carboxaldehído	tampón B	Co-disolvente	lisado
10% de co-disolvente	35	845	80	35
20% de codisolvente	35	765	160	35

El producto precipitado se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Después se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar el Eppis a 13000 rpm durante 10 min. Se pipeteó el sobrenadante residual. Los gránulos se liofilizaron. Con este fin, el liofilizador se preenfrió a -53°C y las muestras se congelaron a -20°C. Después, las muestras se colocaron al vacío durante 2 horas. Después de esto, la temperatura de la rejilla se aumentó a 40°C y comenzó el secado durante 20 horas. El rendimiento claramente dependía del codisolvente utilizado (véase Figura 1).

La distribución estereoquímica de los productos formados se puede controlar mediante la enzima, así como por el co-disolvente utilizado. En el caso del terc-butanol, las especies principales obtenidas mediante análisis HPLC-UV/HPLC-MS (derivatización en la precolumna OPA/N-acetil-L-cisteína (NAC)) revelaron una distribución estereoquímica del 85 % para las especies principales.

Incorporación del aminoácido con norborneno a la proteína verde fluorescente indicadora

Una pirrolisil-tRNA sintetasa mutante, obtenida a partir de una pirrolisil-tRNA sintetasa de tipo nativo, que es una pirrolisil-tRNA sintetasa derivada de arqueas (tal como *Methanosarcina* o *Methanocaldococcus* u otro), y/o la pirrolisil-tRNA sintetasa mutante aminoacila un tRNA de pirrolisina, incorpora aminoácidos como se describe en la presente memoria. La pirrolisil-tRNA sintetasa mutante se generó mediante tecnologías de ingeniería de proteínas de última generación, tal como la mutagénesis de saturación del sitio guiada por la estructura o la evolución dirigida o una combinación. También, serían posibles otras tecnologías, tal como la combinación de genes.

La pirrolisil-tRNA sintetasa mutante y el correspondiente supresor ámbar de pirrolisina tRNA se introdujeron en un vector de expresión que alberga un origen de replicación p15a, una variante de la proteína indicadora verde fluorescente que lleva un codón de terminación ámbar marco en la posición de aminoácido 39 [Y39X], así como una etiqueta de hexahistidina N-terminal y un gen de resistencia a la kanamicina. La pirrolisil-tRNA sintetasa mutante se expresó a partir de un promotor inducible por arabinosa y el supresor de pirrolisina tRNA a partir de un promotor constitutivo comúnmente utilizado para este propósito.

Se cultivaron células de *E. coli* que albergaban el vector de expresión descrito anteriormente en matraces de 250 ml, cada uno de los cuales contenía 50 ml de medio mínimo M9 con 50 µg/mL de kanamicina (Roth) y glucosa al 1-2 % como fuente C. Los cultivos se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 160-180 rpm. A D600 de 0,8-1,0, se indujo la expresión de PylRS añadiendo 0,2% (p/v) de arabinosa (Roth). Además, Norl 5-10 mM se disolvió en NaOH 1 M. La expresión se llevó a cabo entre 4 y 24 horas (la temperatura se puede ajustar dependiendo de la enzima objetivo; 37°C para eGFP). Las células se recogieron por centrifugación (5000 g durante 30 minutos a 4ºC). La variante de eGFP se purificó mediante cromatografía de afinidad con Ni2+ usando agarosa Ni-NTA siguiendo las instrucciones del fabricante.

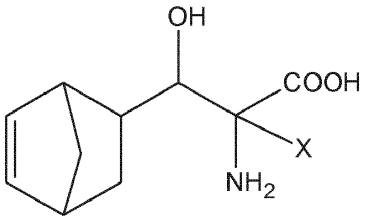
La variante de eGFP purificada que lleva la Norl se modificó mediante química de conjugación aplicando un tinte fluorescente que lleva tetrazina como compañero de reacción, tal como 6-metil-tetrazina-5-TAMRA. Las reacciones se

realizaron en tampón MES 100 mM pH 6 y se incubaron entre 4 y 24 horas. Las muestras de eGFP marcadas con TAMRA se separaron en gel SDS prefabricado siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles se expusieron a la luz ultravioleta para detectar la fluorescencia de TAMRA y posteriormente se tiñeron con Coomassie Blue siguiendo los procedimientos estándar. Se eliminó la banda con el tamaño esperado de eGFP (~ 28 kDa, véase la Figura 2).

La presencia del compuesto con Norl, así como la modificación de TAMRA, se confirmó mediante secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem. La modificación exitosa de TAMRA también se confirmó mediante la obtención de una señal de fluorescencia de TAMRA del tamaño de eGFP.

REIVINDICACIONES

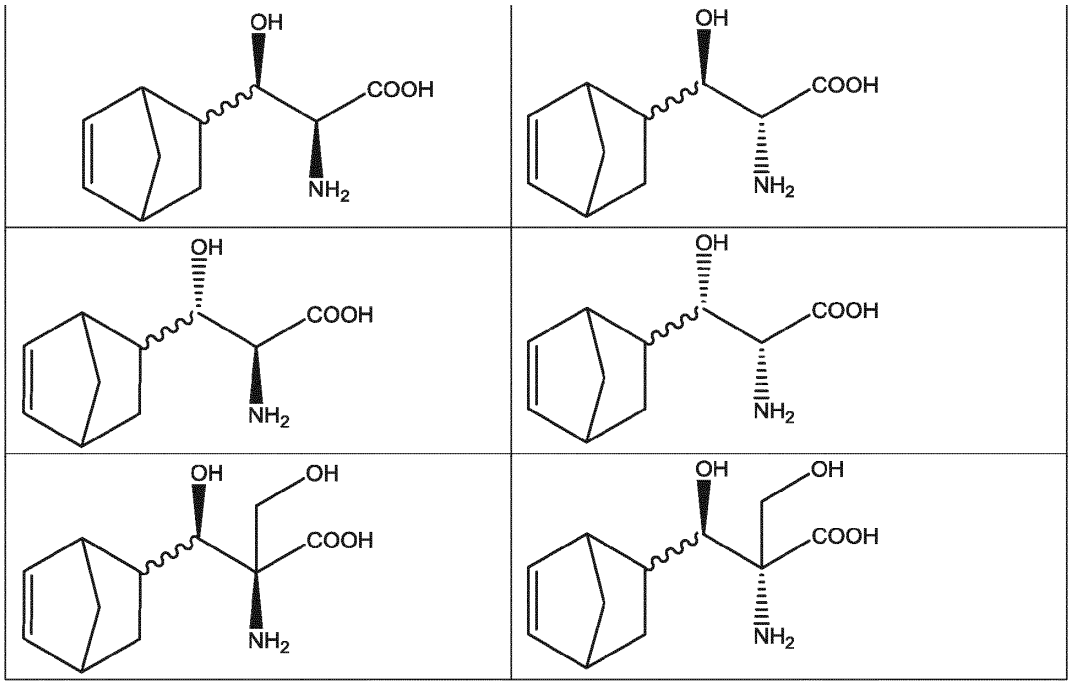
1. Nuevos compuestos de fórmula general I,

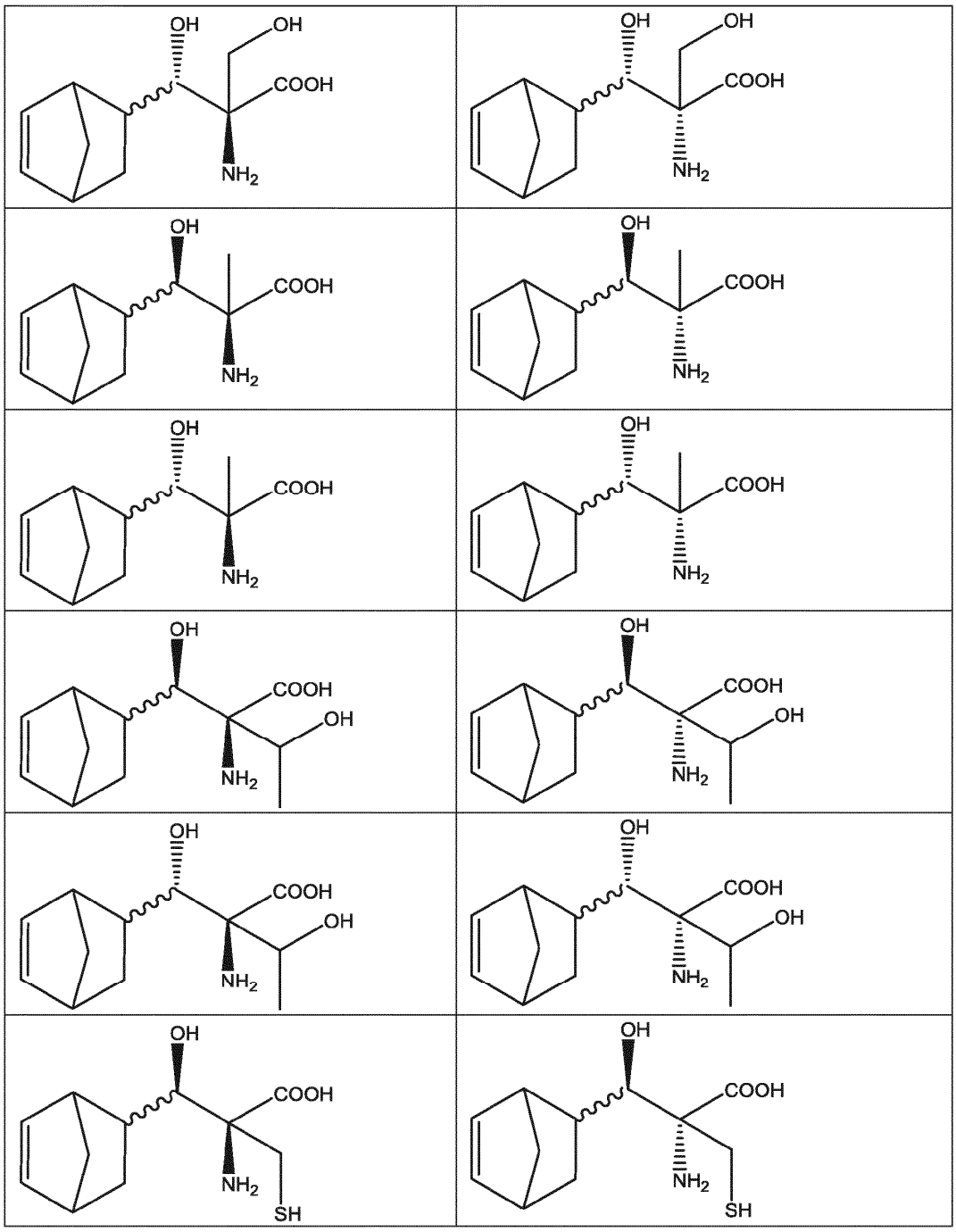


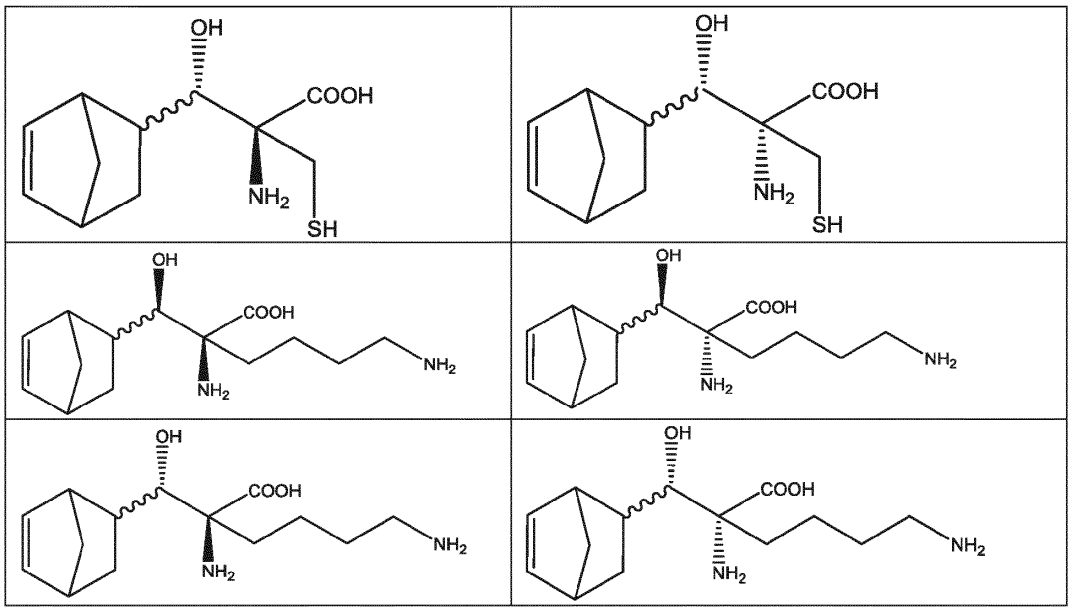
en donde X es un H o un alquilo de C_1-C_6, opcionalmente sustituido con hidroxi, halógeno, amina, tiol o carboxi.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en D- o L-3-norbornen serina, D- o L-2-metil alcohol-3-norbornen serina, D- o L-2-metil-3-norbornen serina, D- o L-2-isopropil alcohol-3-norbornen serina, D- o L-2-metil tiol-3-norbornen serina, D- o L-2-butano amina-3-norbornen serina, D- o L-2-isopentan-3-norbornen serina, D- o L-2-ácido butírico-3-norbornen serina, D- o L-2-metilpirrolidin-3-norbornen serina, D- o L-2-metil(propil)sulfan-3-norbornen serina, D- o L-2-1-butilguanidin-3-norbornen serina, L-2-propionamida-3-norbornen serina, L-2-butiramida-3-norbornen serina.

3. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, seleccionado del grupo que consiste en




OH
OH
COOH
NH2
OH
OH
COOH
NH2
OH
COOH
NH2
OH
COOH
NH2
OH
COOH
NH2
OH
COOH
NH2
OH
COOH
OH
NH2
OH
COOH
OH
NH2
OH
COOH
OH
NH2
OH
COOH
OH
NH2
OH
COOH
NH2
SH
OH
COOH
NH2
SH



4. Un método para producir compuestos de fórmula general I, que comprende la etapa de hacer reaccionar el norbornen-2-carboxaldehído con un aminoácido en presencia de treonina aldolasa.

5. El método según la reivindicación 4, en el que el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, isoleucina, leucina, treonina, ácido glutámico, prolina, metionina, arginina, asparagina, glutamina, lisina y cisteína.

6. El método según la reivindicación 4 o 5, en el que la treonina aldolasa es de origen eucariótico o procariótico, preferiblemente de origen bacteriano, de levadura o fúngico.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la treonina aldolasa es de *Pseudomonas, Sphingomonas, Azorhizobium, Methylobacterium, Escherichia, Thermotoga, Silicibacter, Paracoccus, Bordetella, Colwellia, Saccharomyces.*

8. El método según la reivindicación 7, en el que la treonina aldolasa es de *Pseudomonas putida.*

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que la treonina aldolasa está comprendida como lisado celular.

10. Un polipéptido que comprende al menos un aminoácido de fórmula general I como se define en la reivindicación 1.

11. El polipéptido según la reivindicación 10, en el que dicho aminoácido que tiene un grupo norborneno se incorpora en una posición correspondiente al resto de aminoácido en el polipéptido de tipo nativo.

12. El polipéptido según la reivindicación 10 u 11, en el que dicho grupo norborneno está unido a un grupo tetrazina.

13. Un método para producir un polipéptido que comprende un grupo norborneno, que comprende proporcionar un polipéptido según la reivindicación 10 u 11, poner en contacto dicho polipéptido con un compuesto de tetrazina o azida e incubar para permitir la unión de la tetrazina o la azida al grupo norborneno mediante una reacción de cicloadición.

14. Un método para producir un polipéptido de la reivindicación 10, en el que el compuesto de fórmula general I se incorpora genéticamente a un polipéptido o a través de la síntesis de péptidos.

15. El uso de un compuesto de fórmula general I como compuesto de bloque de construcción para síntesis química o como sintón para ingredientes farmacéuticos.

Fig. 1

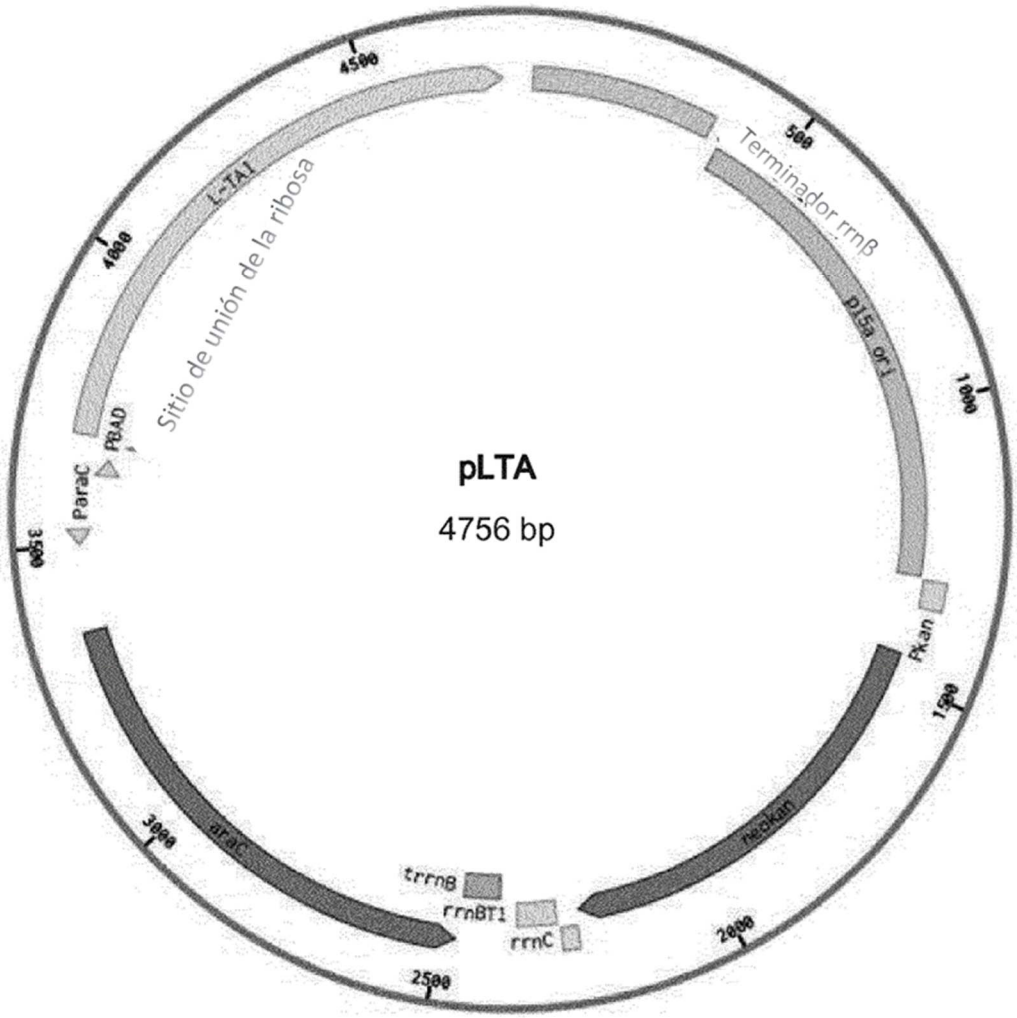

pLTA
4756 bp
Sitio de unión de la ribosa
Terminador rrnβ
L-TAI
PBAD
ParaC
p15a ori
Pkan
araC
trrnB
rrnBT1
rrnC
neokan
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500

Fig. 2

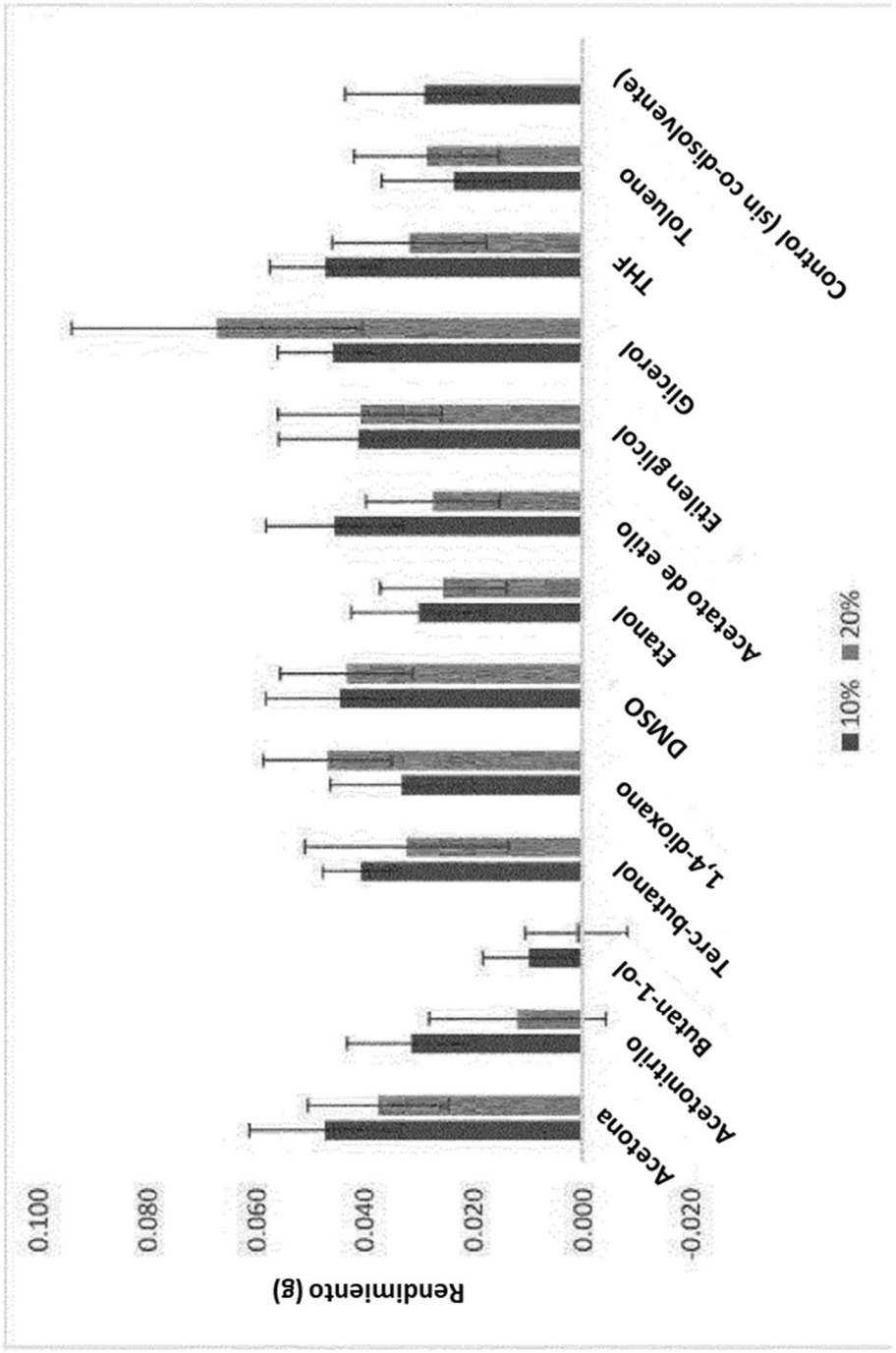

Rendimiento (g)
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
-0.020
Acetona
Acetonitrilo
Butan-1-ol
Terc-butanol
1,4-dioxano
DMSO
Etanol
Acetato de etilo
Etilen glicol
Glicerol
THF
Tolueno
Control (sin co-disolvente)
10%
20%

Fig. 3

