



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 742 296**

⑮ Int. Cl.:

A61K 38/22	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
C07K 14/64	(2006.01)	A61P 17/02	(2006.01)
C07K 17/08	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)
C07H 21/04	(2006.01)		
C07K 1/04	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12P 21/02	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011 PCT/US2011/048157**

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024452**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11818758 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2605789**

⑭ Título: **Polipéptidos de relaxina modificados y sus usos**

⑩ Prioridad:

17.08.2010 US 374582 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

**KRAYNOV, VADIM;
KNUDSEN, NICK;
HEWET, AMHA;
DE DIOS, KRISTINE;
PINKSTAFF, JASON y
SULLIVAN, LORRAINE**

⑭ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 742 296 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

Polipéptidos de relaxina modificados y sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polipéptidos de relaxina modificados con al menos un aminoácido codificado de modo no natural.

10 **Antecedentes de la invención**

La relaxina humana madura es un péptido hormonal de aproximadamente 6000 daltons conocido por ser responsable de remodelar el tracto reproductor antes del parto, facilitando así el proceso de parto. Parece que esta proteína modula el reestructuramiento de los tejidos conectivos en los órganos diana para obtener los cambios necesarios en la estructura de los órganos durante el embarazo y el parto. Véase, Hisaw, F.L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 23: 661-663 (1926); Schwabe, C. y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 75: 503-570 (1977); James, R. y col., Nature, 267: 544-546 (1977). Una revisión concisa de la relaxina fue proporcionada por Sherwood, D. en The Physiology of Reproduction, Capítulo 16, "Relaxin", Knobil, E. y Neill, J. y col. (eds.), (Raven Press Ltd., Nueva York), pp. 585-673 (1988). Los niveles circulantes de relaxina aumentan durante los nueve meses del embarazo y disminuyen rápidamente después del parto.

Aunque sea predominantemente una hormona del embarazo, también se ha detectado la relaxina en mujeres no embarazadas, así como en hombres. Bryant-Greenwood, G.D., Endocrine Reviews, 3: 62-90 (1982) y Weiss, G., Ann. Rev. Physiol., 46:43-52 (1984) y más recientemente se ha descubierto que resulta útil en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca.

La insuficiencia cardiaca se define como la incapacidad de la bomba cardiaca de mover la sangre según sea necesario para cubrir las necesidades metabólicas del tejido corporal. Las disminuciones de la capacidad de bombeo surgen por lo general por pérdida o daño del tejido miocárdico. Como consecuencia, se suprime el vaciamiento ventricular y esto provoca un aumento en la presión de llenado ventricular y en la tensión de la pared ventricular, y una disminución del gasto cardiaco. Como respuesta fisiológica a la disminución en el gasto cardiaco, se activan numerosos reflejos neuroendocrinos que provocan vasoconstricción sistémica, estimulación simpática del corazón y retención de líquidos. Aunque estas respuestas reflejas inicialmente tienden a potenciar el gasto cardiaco, resultan perjudiciales a largo plazo. Los aumentos resultantes en la resistencia periférica aumentan la poscarga cardiaca y los aumentos en el volumen de sangre aumentan más la presión de llenado ventricular. Estos cambios, junto con el aumento de la estimulación simpática del corazón, provocan una mayor, y más frecuente, demanda de descompensación sobre el miocardio funcional restante.

40 La insuficiencia cardiaca congestiva, que es un criterio de valoración común para muchos trastornos cardiovasculares, se produce cuando el corazón no puede perfundir adecuadamente los tejidos periféricos. Según cálculos recientes, se ha diagnosticado a aproximadamente 4 millones de personas en Estados Unidos con esta enfermedad, y más del 50 % de estos casos son fatales dentro de los 5 años del diagnóstico [Taylor, M.D. y col., Annual Reports in Med. Chem. 22, 85-94 (1987)].

45 Las terapias actuales para la insuficiencia cardiaca, incluyendo la insuficiencia cardiaca congestiva, se concentran en aumentar el gasto cardiaco sin provocar demandas indebidas sobre el miocardio. Para lograr estos fines, se utilizan diversas combinaciones de diuréticos, vasodilatadores y agentes inotrópicos para disminuir el volumen de sangre, para disminuir la resistencia periférica y para aumentar la fuerza de la contracción cardiaca. Por lo tanto, la terapia actual depende del equilibrio de los efectos de múltiples fármacos para lograr las necesidades clínicas de los pacientes individuales y está plagada de reacciones adversas a los fármacos utilizados.

55 Por ejemplo, los diuréticos disminuyen las concentraciones plasmáticas de potasio y magnesio, y aumentan la incidencia de las arritmias en pacientes que reciben digitálicos. Los diuréticos pueden potenciar los efectos circulatorios de los nitratos a través de la disminución del volumen y provocar disminuciones en la presión de llenado del corazón, el gasto cardiaco y la presión arterial sistémica.

55 Los antagonistas alfa adregénicos pueden provocar caídas importantes en la presión arterial sistémica que comprometen la perfusión coronaria.

60 Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina pueden tener efectos similares sobre la presión arterial y además provocar aumentos excesivos en las concentraciones plasmáticas de potasio.

65 Los fármacos que producen inotropismo positivo, como los digitálicos y los antagonistas beta adregénicos, tienen el potencial de provocar arritmias. Además, los digitálicos tienen un índice terapéutico bajo y los análogos de la catecolamina tienden a perder la eficacia rápidamente, debido a la regulación negativa del receptor.

Por lo tanto, existe la necesidad de agentes terapéuticos que produzcan respuestas integradas fisiológicamente de vasodilatación arterial y venosa e inotropismo cardiaco, y que no presenten las desventajas de los agentes terapéuticos utilizados actualmente.

5 Se ha purificado la relaxina de diversas especies incluyendo porcina, murina, equina, de tiburón, de tigre, de rata, de
 10 cazón y humana, y presenta al menos homología estructural primaria y secundaria con la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina, sin embargo, la homología entre las especies puede ser bastante baja. En el ser humano, la relaxina se encuentra con mayor abundancia en el cuerpo lúteo (CL) del embarazo. Sin embargo, determinados núcleos en el cerebro tienen receptores de relaxina y otros núcleos contienen ARN mensajero para la
 15 relaxina. Varios núcleos con células que tienen receptores de relaxina se encuentran en el área del hipotálamo.

20 Se han identificado dos formas genéticas humanas, (H1) y (H2). Hudson, P. y col., *Nature*, 301: 628-631 (1983);
 25 Hudson, P. y col., *The EMBO Journal*, 3: 2333-2339 (1984); y las patentes de EE.UU. N.º 4.758.516 y 4.871.670. Se ha descubierto que solo una de las formas genéticas (H2) se transcribe en el CL. Aún no está claro si la forma (H1) se expresa en otro sitio del tejido o si representa a un pseudogén. Cuando se evaluó la actividad biológica de la relaxina humana sintética (H2) y de determinados análogos de la relaxina humana, las pruebas revelaron la necesidad de un núcleo de relaxina para la actividad biológica, así como determinadas sustituciones de aminoácidos por metionina que no afectaban la actividad biológica. Johnston y col. en *Peptides: Structure and Function*, Proc. Ninth American Peptide Symposium, Deber, C. M. y col. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985).

20 Los métodos para preparar la relaxina también se describen en la patente de EE.UU. N.º 4.835.251 y en N.º de serie de EE.UU. co-pendientes 07/908.766 (PCT US90/02085) y 08/080.354 (PCT US94/0699). Los métodos para usar la relaxina en la terapia cardiovascular y en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.166.191 y en N.º de serie de EE.UU. 07/902.637 (PCT US92/06927). Determinadas formulaciones de relaxina humana se describen en N.º de serie de EE.UU. aprobado 08/050.745.

30 El documento US2007004619 A1 describe la preparación de un análogo de relaxina denominado "cR1x" que tiene dos sustituciones de cisteína en la posición 3 y 25 de la cadena B. El análogo de relaxina cR1x se probó para la unión a dos receptores, LGR7 y LGR8. El documento WO2008077079 A1 se refiere generalmente a una sustitución con aminoácidos codificados de modo no natural en péptidos de interés y menciona la relaxina como un miembro de una lista extensiva de aproximadamente 175 polipéptidos y clases de polipéptidos, incluyendo clases como se definen ampliamente como "anticuerpo" y "citocina". El documento US2005170404 describe la unión covalente de PEG a proteínas.

35 La relaxina humana recombinante (H2) se encuentra actualmente en ensayos clínicos humanos en fase I en pacientes de esclerodermia. La esclerodermia es una enfermedad que implica un desequilibrio en la reformación de los tejidos que da lugar a la sobreproducción de colágeno y que, en última instancia, provoca la inflamación y el endurecimiento de la piel (y de los órganos afectados). Los tratamientos actuales que administran relaxina requieren infusiones repetidas y prolongadas.

40 Sumario de la invención

La invención se refiere a un polipéptido de relaxina modificado que comprende un aminoácido codificado de modo no natural, en donde:

45 (a) el polipéptido de relaxina comprende el polipéptido de cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: resto 1 de cadena A, resto 5 de cadena A, resto 13 de cadena A, resto 18 de cadena A y resto 7 de cadena B; y
 50 (b) el aminoácido codificado de modo no natural es para-acetil-fenilalanina que está opcionalmente enlazado a un enlazador, polímero, polímero soluble en agua o molécula biológicamente activa.

55 La invención proporciona de esta manera polipéptidos de relaxina modificados con al menos un aminoácido codificado de modo no natural.

En un aspecto de la presente invención, los polipéptidos de relaxina con al menos un aminoácido codificado de modo no natural están unidos a al menos un polímero soluble en agua.

60 La invención también se refiere a los polipéptidos de relaxina modificados para su uso como un medicamento, en particular para su uso en, o el uso de dichas relaxinas modificadas en la fabricación de un medicamento para, el tratamiento de un sujeto que sufre de aterosclerosis; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; cardiopatía coronaria; esclerodermia; ictus; disfunción diastólica; hipercolesterolemia familiar; hipertensión sistólica aislada; hipertensión primaria; hipertensión secundaria; hipertrofia ventricular izquierda; rigidez arterial asociada a tabaquismo a largo plazo; rigidez arterial asociada a obesidad; rigidez arterial asociada a edad; lupus eritematoso sistémico; preeclampsia; hipercolesterolemia; o para su uso en el aumento de la distensibilidad arterial en mujeres

perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en mujeres posmenopáusicas con riesgo de sufrir alguno de los trastornos mencionados anteriormente; o para modular la vasoconstricción, la producción de NO o la agregación de plaquetas; o para su uso en el tratamiento de vasoconstricción mediada por angiotensina II (AngII) o vasoconstricción mediada por endotelina 1 (ET-1); o para su uso en insuficiencia cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés de la pared ventricular o una integración deteriorada de la vasodilatación arterial y venosa.

En una realización de la invención, la relaxina de la invención es para su uso en un método para aumentar la distensibilidad arterial en un sujeto, en donde dicho método comprende medir la distensibilidad arterial global en dicho sujeto; determinar que dicha distensibilidad arterial global se disminuye en dicho sujeto con respecto a la distensibilidad arterial global en un sujeto sano; y administrar a dicho sujeto una formulación farmacéutica que comprende relaxina para aumentar la distensibilidad arterial en dicho sujeto. Se puede medir la distensibilidad arterial global, en una realización, a partir del descenso diastólico de la forma de onda de la presión aórtica utilizando el método del área. En otra realización, se puede calcular la distensibilidad arterial global como la relación volumen sistólico/presión de pulso, en donde el volumen sistólico se define como la relación entre el gasto cardíaco y la frecuencia cardíaca.

En realizaciones relacionadas, se puede medir la distensibilidad arterial local o la distensibilidad arterial regional de un sujeto además de o como alternativa a la medición de la distensibilidad arterial global y, si la distensibilidad arterial local o regional se disminuye con respecto a la distensibilidad arterial local o regional esperada para un individuo sano en una posición similar, se puede administrar relaxina para aumentar la distensibilidad arterial en ese individuo.

En realizaciones adicionales, el sujeto a quien se administra relaxina sufre uno o más de los siguientes trastornos: aterosclerosis; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; cardiopatía coronaria; esclerodermia; ictus; disfunción diastólica; hipercolesterolemia familiar; hipertensión sistólica aislada; hipertensión primaria; hipertensión secundaria; hipertrofia ventricular izquierda; rigidez arterial asociada a tabaquismo a largo plazo; rigidez arterial asociada a obesidad; rigidez arterial asociada a edad; lupus eritematoso sistémico; preeclampsia e hipercolesterolemia. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona métodos de aumentar la distensibilidad arterial en mujeres perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en individuos quienes estén con riesgo de sufrir uno de los trastornos mencionados anteriormente.

En una realización adicional de la invención, la administración de relaxina aumenta la distensibilidad arterial en al menos el 10 %, 15 %, 20 % o más, con respecto a la distensibilidad arterial medida antes de la administración. En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona la administración de relaxina a individuos con distensibilidad arterial disminuida a una tasa predeterminada para mantener una concentración sérica de relaxina de 0,5 a 80 ng/ml. En una realización, la relaxina es relaxina humana recombinante con un aminoácido codificado de modo no natural. En otra realización, la relaxina es relaxina con más de un aminoácido codificado de modo no natural. En otra realización de la presente invención, la relaxina tiene un aminoácido codificado de modo no natural enlazado a un polímero soluble en agua. En realizaciones relacionadas, la relaxina se puede administrar diariamente, en una formulación inyectable, como una formulación de liberación progresiva o como una infusión continua.

En otro aspecto, la relaxina de la invención es para su uso en el tratamiento de infecciones o heridas isquémicas mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de relaxina. En una realización particularmente preferida, la infección o herida isquémica es una infección o herida isquémica en la cual la lesión es consecuencia de falta de oxígeno debido a la mala circulación.

En otro aspecto de la invención, la relaxina de la invención es para su uso en el tratamiento de una infección o herida isquémica o para la promoción de la angiogénesis. En otro aspecto, la relaxina de la presente invención es para su uso en el tratamiento de la disfunción de la articulación osteodegenerativa y en otro aspecto el tratamiento de la disfunción de la articulación osteodegenerativa comprende hR2 además de uno o más adyuvantes, incluyendo pero no limitado a glucosamina. En otro aspecto, la relaxina de la presente invención es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y en otro aspecto el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer comprende hR2 además de uno o más adyuvantes, incluyendo pero no limitado a estrógeno. En otra realización, la relaxina de la presente invención es para su uso en un método para modular la fisiología reproductiva de mamíferos que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del presente documento.

La relaxina de la invención además es para su uso en métodos para tratar la vasoconstricción mediada por angiotensina II (AngII). Estos métodos generalmente comprenden administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina eficaz para revertir, inhibir o reducir los efectos vasoconstrictores de la AngII.

La relaxina de la invención además es para su uso en métodos para tratar la vasoconstricción mediada por la endotelina 1 (ET-1). Estos métodos generalmente comprenden administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina eficaz para revertir, inhibir o reducir los efectos vasoconstrictores de la ET-1. En algunas realizaciones, los métodos comprenden aumentar la activación del receptor de endotelina tipo B en una célula en un

vaso sanguíneo mediante la administración de relaxina al individuo.

La relaxina de la invención además es para su uso en métodos para tratar una afección isquémica, que generalmente comprenden administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina eficaz para estimular o promover la angiogénesis o la vasodilatación, tratando así la afección isquémica. Los métodos son útiles

5 para tratar diversas afecciones isquémicas. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar una afección isquémica que se produce como consecuencia de un infarto de miocardio. En otras realizaciones, se proporcionan métodos para tratar una afección isquémica asociada con una herida. Por lo tanto, la invención proporciona además métodos para promover la cicatrización de una herida.

10 La relaxina de la invención además es para su uso en métodos para estimular la expresión de citocinas angiogénicas y/o vasodilatadoras que generalmente comprenden administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina eficaz para vasodilatar los vasos sanguíneos y/o estimular o promover la producción de citocinas angiogénicas. En algunas realizaciones, los métodos promueven estimular la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y/o del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Estos métodos son útiles para tratar una amplia gama de enfermedades que se pueden tratar mediante el aumento del flujo sanguíneo en el sitio de la enfermedad o cerca de este.

15 La relaxina de la invención además es para su uso en un método para aumentar la hiperfiltración y la vasodilatación renales, que generalmente comprende administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina. Estos métodos son útiles para tratar diversas patologías renales. En consecuencia, la invención proporciona además métodos para tratar una patología renal relacionada con la vasoconstricción.

20 La relaxina de la invención además es para su uso en un método para reducir la hipertensión pulmonar, que generalmente comprende administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina.

25 En las patentes cedidas a Connetics Corporation y a BAS Medical, Inc, patentes de EE.UU. número 6.211.147 y 6.780.836 respectivamente, se desvelaron métodos para promover la angiogénesis utilizando relaxina. En una patente cedida a Genentech, Inc., patente número 5.759.807, se desvela un proceso para la producción procariota de relaxina a partir de prorrelaxina. La patente de EE.UU. 6.251.863 de Yue desvela métodos para tratar la 30 disfunción de la articulación osteodegenerativa y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer mediante la administración de medicamentos de relaxina que además comprenden sulfato de glucosamina y estrógeno, respectivamente para cada una de las afecciones.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más modificaciones postraduccionales. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina está enlazado a un enlazador, un polímero o una molécula biológicamente activa. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina está enlazado a un polímero bifuncional, un enlazador bifuncional o al menos a un polipéptido de relaxina adicional.

40 En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una porción de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado al polímero soluble en agua con un enlazador o está enlazado al polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero bifuncional. En algunas realizaciones, el polímero bifuncional está unido a un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es un polipéptido de relaxina.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende al menos dos aminoácidos enlazados a un polímero soluble en agua que comprende una porción de poli(etilenglicol), en donde al menos un aminoácido es un aminoácido codificado de modo no natural.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende al menos dos aminoácidos enlazados a un polímero soluble en agua que comprende una porción de poli(etilenglicol), en donde al menos un aminoácido es un aminoácido codificado de modo no natural.

55 En algunas realizaciones se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 1 (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 5 (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la cadena B en la posición de aminoácido 7 (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 13 (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 18. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 5, 13 (SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 u otras secuencias de

- relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 5 (SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 5 (SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas).
- 5 En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena B en la posición de aminoácido 7 (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2 o 3). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en la posición 7 en la cadena B (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2 o 3). En una realización, se incorpora un aminoácido codificado de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en las posiciones de aminoácidos 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3), en la cadena B en las posiciones de aminoácidos 7 (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en las posiciones de aminoácidos 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3), en la cadena B en las posiciones de aminoácidos 7 (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3).
- 10 En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a: en la cadena A 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a: en la cadena A 1, 5 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a: en la cadena A 5 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a: en la cadena A 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluyendo, pero no limitado a: en la cadena B 7 (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en la posición 7 en la cadena B (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3) está enlazado a un polímero soluble en agua.
- 15 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina: posiciones en la cadena B 7 (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3) y posiciones en la cadena A 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina: posiciones en la cadena B 7 (SEQ ID NO: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3) y posiciones en la cadena A 1, 5, 13, 18 (SEQ ID NO: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2, 3) y el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua.
- Los métodos de la presente invención podrían utilizarse para promover la angiogénesis, promover la vasodilatación, promover la vasodilatación no hipotensora, tratar la hipertensión, incluyendo, pero no limitado a la hipertensión renal, hipertensión pulmonar e hipertensión cardiaca (Patentes de EE.UU. N.º 6.723.702 y 6.780.836).
- Formulaciones**
- En la práctica amplia de la presente invención, también se contempla que una formulación pueda contener una mezcla de dos o más de una relaxina, un dímero de relaxina, un análogo de relaxina, una relaxina acilada o un análogo de relaxina acilado con al menos uno de los componentes de una mezcla que contiene un aminoácido codificado de modo no natural. En otra realización de la presente invención, las formulaciones que contienen una mezcla de dos o más de relaxina, un análogo de relaxina, una relaxina acilada o un análogo de relaxina acilado conteniendo al menos uno de los componentes de la mezcla un aminoácido codificado de modo no natural también incluye al menos un polímero soluble en agua unido a al menos uno de los aminoácidos codificados de modo no natural.
- La presente invención también incluye mezclas heterogéneas en donde se preparan polipéptidos de relaxina y análogos de relaxina mediante los métodos desvelados en la presente invención y después se mezclan para que se

5 pueda administrar una formulación a un paciente que lo necesite. Todas las mezclas diferentes de cantidades porcentuales diferentes de variantes de polipéptidos de relaxina en donde los polipéptidos de relaxina incluyen una variedad (1) con PEG de tamaños diferentes o (2) PEG incluidos en diferentes posiciones en la secuencia. Esto pretende ser un ejemplo y no debe considerarse de ningún modo que limita las formulaciones hechas posibles por la

10 presente invención y que resultarán evidentes para los expertos en la materia. En una realización adicional, las variantes del polipéptido de relaxina para incluir en la mezcla de formulación se elegirán por sus tiempos de disociación variables, de modo que la formulación pueda proporcionar una liberación progresiva de relaxina para un paciente que lo necesite.

10 Las formulaciones de la presente invención pueden incluir un glucagón.

Otras realizaciones de la presente invención que incluyen una formulación para inhalación

15 En una realización adicional de la presente invención, es posible utilizar la tecnología desvelada en el presente documento para la producción de análogos de relaxina con propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas aumentadas para su uso en pacientes a través de administración al pulmón, dando como resultado niveles elevados de relaxina en sangre que se mantienen durante al menos 6 horas y más normalmente durante al menos 8, 10, 12, 14, 18, 24 horas o más después de la administración. Otra realización de la presente invención permite el diseño de mezclas ventajosas de análogos de relaxina adecuadas para formulaciones terapéuticas diseñadas para

20 administrarse a pacientes como un inhalante.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, se pueden sustituir los siguientes sitios en la molécula de relaxina nativa con aminoácidos codificados de modo no natural y opcionalmente se pueden modificar más mediante la unión covalente de un polímero soluble en agua, tal como PEG: los 2 extremos carboxilo terminales de las cadenas A y B, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B y Glu21B.

30 La presente invención proporciona polipéptidos de relaxina no nativa y análogos de relaxina no nativa que tienen uno o más aminoácidos codificados de modo no natural sustituidos o insertados en la secuencia señal que también puede proporcionar un sitio para la incorporación de uno o más polímeros solubles en agua, tales como PEG. Esta realización de la invención resulta especialmente útil para introducir sitios de pegilación adicionales personalizados dentro de la molécula de relaxina, por ejemplo, para formar una PEG-relaxina que tiene una resistencia mejorada a la degradación enzimática. Este enfoque proporciona mayor flexibilidad en el diseño de un conjugado de relaxina optimizado que tiene el equilibrio deseado de actividad, estabilidad, solubilidad y propiedades farmacológicas. Se pueden realizar mutaciones, es decir, mediante mutagénesis específica del sitio, en cualquier cantidad de posiciones dentro de la molécula de relaxina. Los PEG para su uso en la presente invención pueden poseer diversas estructuras: lineal, bifurcada, ramificada, tipo mancuerna y similares. normalmente, el PEG se activa con un grupo activador apropiado apropiado para acoplar uno o más sitios deseados en la molécula de relaxina. Un PEG activado poseerá un grupo reactivo en un extremo terminal para la reacción con relaxina. Los derivados de PEG activados representativos y los métodos para conjugar estos agentes en un fármaco como relaxina se conocen en la técnica y

40 se han descrito más detalladamente en Zalipsky, S. y col., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992) y en Advanced Drug Reviews, 16:157-182 (1995).

45 En una realización particular de la invención, la porción de PEG del conjugado está ausente en uno o más grupos lipófilos eficaces para modificar significativamente la naturaleza soluble en agua del polímero o del conjugado polímero-relaxina. Es decir, la porción de polímero o la porción no relaxina de un conjugado de la invención puede contener un grupo de átomos que se considera que es más lipófilo que hidrófobo (por ejemplo, una cadena de carbono que tiene de aproximadamente 2 a 8-12 átomos de carbono), sin embargo, si la presencia del grupo o grupos no resulta eficaz para modificar significativamente la naturaleza hidrófoba del polímero o del conjugado, entonces tal porción puede estar contenida en los conjugados de la invención. Es decir, a través de mutaciones específicas del sitio de relaxina, polipéptidos de relaxina y análogos de relaxina, un conjugado de relaxina de la invención mismo puede ser hidrófobo, en lugar de lipófilo o anfífilo. En determinadas realizaciones de la invención en donde puede estar presente una porción lipófila, preferentemente la porción no se ubica en un extremo terminal de una cadena de PEG.

55 Los PEG ramificados para su uso en los conjugados de la invención incluyen los descritos en la publicación de patente internacional WO 96/21469. Generalmente, los PEG ramificados se pueden representar por la fórmula R(PEG-OH).sub.n, en donde R representa la molécula "núcleo" central y. sub.n representa la cantidad de brazos. Los PEG ramificados tienen un núcleo central desde donde se extienden 2 o más brazos de "PEG". En una configuración ramificada, el núcleo del polímero ramificado posee un único sitio reactivo para la unión a la relaxina. Los PEG ramificados para su uso en la presente invención comprenderán normalmente menos de 4 brazos de PEG y más preferentemente, comprenderán menos de 3 brazos de PEG. Los PEG ramificados ofrecen la ventaja de tener un único sitio reactivo acoplado con una nube de polímeros más densa y grande que sus contrapartes de PEG lineales. Un tipo específico de PEG ramificado se puede representar como (MeO-PEG-).sub.p R-X, en donde p es igual a 2 o 3, R es una estructura núcleo central como lisina o glicerol que tiene 2 o 3 brazos de PEG unidos al mismo y X representa cualquier grupo funcional adecuado que se activa o que se puede activar para acoplarse a la

relaxina. Un PEG ramificado particularmente preferido es mPEG2-NHS (Shearwater Corporation, Alabama) que tiene la estructura mPEG2-lisina-succinimida.

En otra arquitectura ramificada más, "PEG colgante" tiene grupos reactivos para el acoplamiento de proteínas ubicados a lo largo de la estructura de PEG en lugar de al final de las cadenas de PEG. Los grupos reactivos que se extienden de la estructura de PEG para acoplarse a la relaxina pueden ser iguales o diferentes. Las estructuras de PEG colgantes pueden ser útiles pero en general son menos preferidas, especialmente para las composiciones para inhalación.

Alternativamente, la porción de PEG de un conjugado de PEG-relaxina puede poseer una estructura bifurcada que tiene una porción ramificada en un extremo de la cadena polimérica y dos grupos reactivos libres (o cualquier múltiplo de 2) unidos a la porción ramificada para la unión a la relaxina. Los PEG bifurcados a modo de ejemplo se describen en la publicación de patente internacional N.º WO 99/45964. El polietenglicol bifurcado puede incluir opcionalmente un grupo alquilo o "R" en el extremo opuesto de la cadena polimérica. Más específicamente, un conjugado de PEG-relaxina bifurcado de acuerdo con la invención tiene la fórmula: R-PEG-L(Y-relaxina) n en donde R es alquilo, L es un punto de ramificación hidrolíticamente estable e Y es un grupo enlazador que proporciona el enlace químico del polímero bifurcado con la relaxina, y n es un múltiplo de 2. L puede representar un único grupo de "núcleo", tal como "--CH--" o puede comprender una cadena de átomos más larga. Algunos grupos L a modo de ejemplo incluyen lisina, glicerol, pentaeritritol o sorbitol. normalmente, el átomo de ramificación particular dentro de la porción ramificada es carbono.

En una realización particular de la invención, el enlace del PEG bifurcado con la molécula de relaxina, (Y), es hidrolíticamente estable. En una realización preferida, n es 2. Las fracciones Y adecuadas, antes de la conjugación con un sitio reactivo en la relaxina, incluyen, pero no se limitan a, ésteres activos, carbonatos activos, aldehídos, isocianatos, isocianatos, epóxidos, alcoholes, maleimidas, vinilsulfonas, hidrazidas, ditiopiridinas y yodacetamidas. La selección de un grupo activador adecuado dependerá del sitio de unión deseado en la molécula de relaxina y puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. El grupo Y correspondiente en el conjugado de PEG-relaxina resultante es el que resulta de la reacción del polímero bifurcado activado con un sitio reactivo adecuado en la relaxina. La identidad específica del enlace final será evidente para los expertos en la materia. Por ejemplo, si el PEG bifurcado reactivo contiene un éster activado, tales como un éster de succinimida o maleimida, la conjugación a través de un sitio amina en la relaxina provocará la formación del enlace amida correspondiente. Estos polímeros bifurcados particulares son particularmente atractivos porque proporcionan conjugados que tienen una relación molar de relaxina a PEG de 2:1 o superior. Estos conjugados tienen menor probabilidad de bloquear el sitio receptor de relaxina sin dejar de proporcionar flexibilidad en el diseño para proteger a la relaxina de la degradación enzimática, por ejemplo, mediante la enzima que degrada la relaxina.

En una realización relacionada, se puede usar un conjugado de PEG-relaxina bifurcado en la presente invención, representado por la fórmula: R-[PEG-L(Y-relaxina)2] n . En este caso R representa un aminoácido codificado de modo no natural que tiene unido al mismo al menos un conjugado de PEG-di-relaxina. Específicamente, los polímeros bifurcados preferidos de acuerdo con este aspecto de la invención son aquellos en donde n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización alternativa, el enlace químico entre el aminoácido no natural dentro de la relaxina, polipéptido de relaxina o análogo de relaxina y el punto de ramificación del polímero puede ser degradable (es decir, hidrolíticamente inestable). Alternativamente, la estructura polimérica puede contener uno o más enlaces degradables para permitir la generación *in vivo* de un conjugado de PEG-relaxina que tiene una cadena de PEG más pequeña que en el conjugado administrado inicialmente. Por ejemplo, se puede administrar un conjugado grande y relativamente inerte (es decir, que tiene una o más cadenas de PEG de alto peso molecular unidas, por ejemplo, una o más cadenas de PEG que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 10.000, en donde el conjugado esencialmente no posee bioactividad), que después en el pulmón o en el torrente sanguíneo, se hidroliza para generar un conjugado bioactivo que posee una porción de la cadena de PEG presente originalmente. Tras la escisión *in vivo* del enlace degradable hidrolíticamente, la relaxina libre (dependiendo de la posición del enlace degradable) o la relaxina que tiene una pequeña cola de polietileno unida, es liberada y absorbida más fácilmente a través del pulmón y/o circula en la sangre.

En una característica de esta realización de la invención, el conjugado de polímero intacto, antes de la hidrólisis, se degrada mínimamente tras la administración, de modo que la hidrólisis del enlace escindible es eficaz para controlar la tasa de liberación baja de la relaxina activa al torrente sanguíneo, contrariamente a la degradación enzimática de la relaxina antes de su liberación a la circulación sistémica.

Los enlaces escindibles fisiológicamente apropiados incluyen, pero no se limitan a éster, éster carbonato, carbamato, sulfato, fosfato, aciloxialquil éter, acetal y cetal. Tales conjugados deben poseer un enlace escindible fisiológicamente que sea estable después del almacenamiento y la administración. Por ejemplo, un conjugado de PEG-enlace escindible-relaxina debe mantener su integridad tras la fabricación de la composición farmacéutica final, tras la disolución en un vehículo de administración adecuado, si se emplea, y tras la administración independientemente de la vía.

Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo

no natural en una relaxina de cadena única o análogo de relaxina de cadena única.

En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado de modo no natural en la secuencia señal. En algunas realizaciones, el

5 polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado de modo no natural en la secuencia señal para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina desvelados en la presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado natural en la secuencia señal, así 10 como una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado de modo no natural en la secuencia señal para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina desvelados en a presente memoria descriptiva. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos no naturales en la secuencia señal o líder para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina desvelados en a presente memoria descriptiva.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la afinidad del polipéptido de relaxina por un receptor del polipéptido de relaxina o pareja de unión, incluyendo, pero no limitado a, una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la estabilidad del polipéptido de relaxina en comparación con la estabilidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

20 La estabilidad o la solubilidad se pueden medir utilizando diversos ensayos conocidos por los expertos en la materia. Estos ensayos incluyen, entre otros, SE-HPLC y RP-HPLC. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la inmunogenicidad del polipéptido de relaxina en comparación con la inmunogenicidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En 25 algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la vida media sérica o el tiempo de circulación del polipéptido de relaxina en comparación con la vida media sérica o el tiempo de circulación de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad en agua del polipéptido de relaxina en comparación con la solubilidad en agua de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad del polipéptido de relaxina producido en una célula hospedadora en comparación con la solubilidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la expresión del polipéptido de relaxina producido en una célula hospedadora o aumenta la síntesis *in vitro* en comparación con la expresión o síntesis de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. El polipéptido de relaxina que comprende esta sustitución mantiene la actividad agonista y mantiene o mejora los niveles de expresión en una célula hospedadora. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la resistencia a la proteasa del polipéptido de relaxina en comparación con la resistencia a la proteasa de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En 40 algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la actividad de transducción de señales del receptor de relaxina en comparación con la actividad del receptor tras la interacción con el polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula su 45 unión con otra molécula tal como un receptor en comparación con la unión del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula su actividad antivírica en comparación con la actividad antivírica del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas 50 realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que potencia su actividad metabolizadora de la glucosa en comparación con la actividad metabolizadora de la glucosa del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la compatibilidad del polipéptido de relaxina con los conservantes farmacéuticos (por ejemplo, m-cresol, fenol, alcohol bencílico) en comparación con la compatibilidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. Esta compatibilidad aumentaría la preparación de una formulación farmacéutica conservada que mantiene las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de la proteína durante el almacenamiento.

60 En algunas realizaciones, uno o más enlaces diseñados se crean con uno o más aminoácidos no naturales. El enlace intramolecular se puede crear de muchas formas, incluyendo pero no limitado a, una reacción entre dos aminoácidos en la proteína en condiciones adecuadas (uno o ambos aminoácidos pueden ser un aminoácido no natural); una reacción con dos aminoácidos, cada uno de los cuales puede ser codificado natural o codificado de modo no natural, con un enlazador, polímero u otra molécula en condiciones adecuadas; etc.

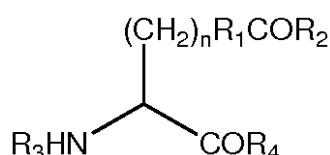
65 En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de relaxina pueden ser por uno o más aminoácidos naturales o codificados de modo no natural. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de relaxina pueden ser por aminoácidos naturales o codificados de modo no natural,

siempre que al menos una sustitución sea por un aminoácido codificado de modo no natural. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos en el polipéptido de relaxina pueden ser por uno o más aminoácidos naturales y adicionalmente al menos una sustitución es por un aminoácido codificado de modo no natural.

5 De acuerdo con la invención, el aminoácido codificado de modo no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: resto 1 de cadena A, resto 5 de cadena A, resto 13 de cadena A, resto 18 de cadena A y resto 7 de cadena B es para-acetil-fenilalanina.

10 También se desvelan en el presente documento aminoácidos codificados de modo no natural que comprenden un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

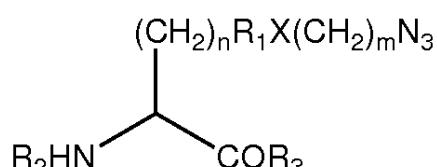
15 En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo carbonilo. En algunos casos, el aminoácido codificado de modo no natural tiene la estructura:



20 en donde n es 0-10; R1 es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R2 es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R4 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal.

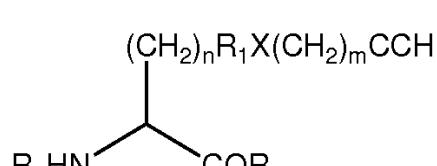
25 En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo aminooxi. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo hidrazida. En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo hidrazina. En algunos casos, un resto de aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo semicarbazida.

En algunos casos, un resto de aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo azida. En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural tiene la estructura:



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

35 En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo alquino. En algunos casos, un aminoácido codificado de modo no natural tiene la estructura:



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

45 En algunos casos, el polipéptido es un agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina comprende un aminoácido codificado de modo no natural enlazado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una porción de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina comprende un aminoácido codificado de modo no natural y una o más modificaciones postraduccionales, enlazadores, polímeros o moléculas biológicamente activas.

- La presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de relaxina de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de relaxina de SEQ ID NO: 1 y 2. La 5 presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden uno o más polinucleótidos que hibridan en condiciones estrictas a polinucleótidos que codifican los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 en donde el polinucleótido comprende al menos un codón selector. La presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que 10 hibridan en condiciones estrictas a polinucleótidos que codifican los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1 y 2 en donde el polinucleótido comprende al menos un codón selector. La presente invención desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1 y 2. La presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La presente 15 invención desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1 y 2 con uno o más aminoácidos codificados de modo no natural. La presente invención también desvela ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con uno o más aminoácidos codificados de modo no natural. Resulta evidente para los expertos en la materia que diversos polinucleótidos pueden codificar cualquier polipéptido de la presente invención.
- 20 En algunas realizaciones, el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases.
- 25 La presente invención también proporciona métodos para preparar un polipéptido de relaxina enlazado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto un polipéptido de relaxina aislado que comprende un aminoácido codificado de modo no natural con un polímero soluble en agua que comprende una porción que reacciona con el aminoácido codificado de modo no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural incorporado en el polipéptido de relaxina es reactivo con respecto a un 30 polímero soluble en agua que de otro modo es no reactivo con respecto a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural incorporado en el polipéptido de relaxina es reactivo con respecto a un enlazador, polímero o molécula biológicamente activa que de otro modo son no reactivos con respecto a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes.
- 35 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina enlazado al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace de carbamato.
- 40 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que comprende un grupo aminooxi, hidrazina, hidrazida o semicarbazida.
- 45 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene alquino con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende una porción azida. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino está enlazado a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.
- 50 En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene azida con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende una porción alquino. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino está enlazado a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.
- 55 En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.
- 60 En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. En algunas realizaciones, cada rama del polímero ramificado de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 1 kDa y 100 kDa, o entre 1 kDa y 50 kDa.
- 65 En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua enlazado al polipéptido de relaxina comprende una porción de polialquilenglicol. En algunas realizaciones, el resto de aminoácido codificado de modo no natural incorporado en el polipéptido de relaxina comprende una porción carbonilo y el polímero soluble en agua comprende una porción

aminooxi, hidrazida, hidrazina o semicarbazida.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido de relaxina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua.

La presente invención también proporciona células que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido de relaxina que comprende un codón selector. En algunas realizaciones, las células comprenden una sintetasa ortogonal de ARN o un ARNt ortogonal para sustituir un aminoácido codificado de modo no natural en el polipéptido de relaxina.

La presente invención también proporciona métodos para preparar un polipéptido de relaxina de la invención. En algunas realizaciones, los métodos comprenden cultivar células que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos que codifican un polipéptido de relaxina, una sintetasa ortogonal de ARN o un ARNt ortogonal en condiciones para permitir la expresión del polipéptido de relaxina; y purificar el polipéptido de relaxina a partir de las células y/o el medio de cultivo.

La presente invención también proporciona métodos para aumentar la vida media terapéutica, la vida media sérica o el tiempo de circulación de los polipéptidos de relaxina. La presente invención también proporciona métodos para modular la inmunogenicidad de los polipéptidos de relaxina. En algunas realizaciones, los métodos comprenden sustituir un aminoácido codificado de modo no natural por uno o más aminoácidos en los polipéptidos de relaxina de origen natural y/o enlazar el polipéptido de relaxina a un enlazador, un polímero, un polímero soluble en agua o una molécula biológicamente activa.

25 Se desvelan métodos para tratar a un paciente que lo necesite con una cantidad eficaz de una molécula de relaxina de la presente invención. En algunos casos, los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina está glucosilado. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina no está glucosilado.

35 La presente invención también proporciona polipéptidos de relaxina que comprenden una secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1 y 2, o cualquier otra secuencia de polipéptidos de relaxina (un ejemplo no limitante de estas serían SEQ ID NO: 3 a 12) excepto que al menos un aminoácido está sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una porción de poli(etilenglicol).

40 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1 a 12, o cualquier otra secuencia de polipéptidos de relaxina, en donde al menos un aminoácido está sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende una cadena A y B (por ejemplo SEQ ID NO: 1, 2 y 3; SEQ ID NO: 4 y 5 o 4 y 6 harían la relaxina, etc.), o 45 cualquier otra secuencia de polipéptido de relaxina, en donde al menos un aminoácido está sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1-3. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua está unido al polipéptido a través de una porción de sacárido. En algunas realizaciones, un enlazador, un polímero o una molécula biológicamente activa están unidos al polipéptido de relaxina a través de una porción de sacárido.

55 La presente invención también proporciona un polipéptido de relaxina que comprende un polímero soluble en agua enlazado por enlace covalente al polipéptido de relaxina en un único aminoácido. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una porción de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido enlazado por enlace covalente al polímero soluble en agua es un aminoácido codificado de modo no natural presente en el polipéptido.

60 La presente invención proporciona un polipéptido de relaxina que comprende al menos un enlazador, un polímero o una molécula biológicamente activa, en donde dicho enlazador, polímero o molécula biológicamente activa están unidos al polipéptido a través de un grupo funcional de un aminoácido codificado de modo no natural incorporado ribosómicamente en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido está monoPEGilado. La presente invención también proporciona un polipéptido de relaxina que comprende un enlazador, un polímero o una molécula biológicamente activa que está unida a uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en donde los aminoácidos codificados de modo no natural están incorporados ribosómicamente en el polipéptido en sitios

preseleccionados.

En el alcance de la presente invención, se incluye la secuencia señal o líder de relaxina, un ejemplo de la cual se puede ver como proinsulina. La secuencia señal o líder heteróloga seleccionada debe ser una secuencia reconocida y procesada, por ejemplo mediante el sistema de secreción de la célula hospedadora, secretada, y posiblemente escindida por una peptidasa señal, por la célula hospedadora. Un método para tratar una afección o trastorno con relaxina o un polipéptido o análogo de relaxina de la presente invención implica tratar con relaxina con o sin un péptido señal o líder.

10 La presente invención también desvela métodos para inducir un aumento en el metabolismo de la glucosa, comprendiendo dicho método administrar relaxina a dichas células en una cantidad eficaz para inducir un aumento en la actividad metabólica de la glucosa.

15 En otra realización, la conjugación del polipéptido de relaxina que comprende uno o más aminoácidos codificados de modo no natural con otra molécula, incluyendo pero no limitado a PEG, proporciona relaxina sustancialmente purificada debido a la reacción química única utilizada para la conjugación con el aminoácido no natural. La conjugación de la relaxina que comprende uno o más aminoácidos codificados de modo no natural con otra molécula, tal como PEG, se puede realizar mediante otras técnicas de purificación realizadas antes o después de la etapa de conjugación para proporcionar relaxina sustancialmente pura.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un modelo de la estructura cristalina de la relaxina que se muestra junto con algunas posiciones de restos de aminoácidos seleccionadas para la sustitución.

25 La figura 2 es un modelo de la estructura cristalina de la relaxina que se muestra junto con algunas posiciones de restos de aminoácidos seleccionadas para la sustitución.

La figura 3 es un modelo de la estructura cristalina de la relaxina que se muestra junto con algunas posiciones de restos de aminoácidos seleccionadas para la sustitución.

La figura 4 es un dibujo de la estructura de la cadena A y B de la relaxina humana.

30 La figura 5 muestra un gel de SDS-PAGE de la prorrelaxina producida mediante estos métodos con un aminoácido de la cadena B1 como Ala y una para-acetil fenilalanina en la 13^a posición de aminoácido de la cadena A, sustituido con valina.

La figura 6(A) muestra un gel de SDS-PAGE de relaxina no PEGilada V13pAF junto con un marcador de peso molecular en el carril 1 y relaxina WT recombinante y no recombinante en los carriles 3 y 7 (no reducido (NR) y reducido (R)). La figura 6(B) muestra un gel de SDS-PAGE de relaxina PEGilada V13pAF en los carriles 3 y 4 (no reducido (NR) y reducido (R)) junto con un marcador de peso molecular en el carril 1.

La figura 7 muestra una gráfica de concentración sérica de relaxina en ratas SD en ng/ml con respecto al tiempo para polipéptidos de relaxina de tipo silvestre y AV13 PEGilado diferencialmente.

40 La figura 8(A) muestra una gráfica de la comparación de la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para todos los grupos PEG-RLX dosificados por vía subcutánea en el Ejemplo 40. Se administró una inyección de dosis única a cada animal. N=5 animales por grupo. Los símbolos indican la media ± SD (desviación estándar) de las concentraciones séricas agrupadas con respecto al tiempo.

La figura 8(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,5 mg/kg de 20KPEG-AQ1-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=5 animales por grupo.

45 La figura 9(A) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,5 mg/kg de PEG20-AA5-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=5 animales por grupo.

La figura 9(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,5 mg/kg de PEG20-AR18-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=5 animales por grupo.

50 La figura 10(A) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de PEG20-BV7-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.

La figura 10(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de PEG20-BW28-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.

55 La figura 11 muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de PEG20-AV13-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.

60 La figura 12(A) muestra una gráfica de una comparación de la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para la relaxina rh wt dosificada por vía subcutánea. Se administró una inyección de dosis única a cada animal. N=5 animales por grupo.

La figura 12(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de relaxina rh wt. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.

65 La figura 13(A) muestra una comparación de la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo

- para todos los grupos PEG-RLX dosificados por vía subcutánea o intravenosa. Se administró una inyección de dosis única a cada animal. N=3-5 animales por grupo.
- 5 La figura 13(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,25 mg/kg de 20KPEG-AQ1-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=4 animales por grupo.
- 10 La figura 14(A) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,5 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=5 animales por grupo.
- 15 La figura 14(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,25 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=3 animales por grupo.
- 16 La figura 15 muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,125 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.
- 20 La figura 16(A) muestra una gráfica de la vida media terminal de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD. La figura 16(B) muestra una gráfica de la AUC_{inf} de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.
- 25 La figura 17(A) muestra una gráfica de la C_{max} de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.
- 30 La figura 17(B) muestra una gráfica de la supresión de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.
- 35 La figura 18(A) muestra una gráfica del volumen de distribución de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD. La figura 18(B) muestra una gráfica de una comparación de concentración sérica-tiempo después de una única inyección intravenosa o subcutánea de 0,25 mg/kg de Relaxina 20KPEG-AQ1.
- 40 La Figura 19, partes (A) - (F) muestra los datos de la fase I del Ejemplo 43. La figura 19(A) muestra el efecto de la infusión IV con relaxina de tipo silvestre sobre el consumo de agua y la producción de orina. La figura 19(B) muestra un valor de referencia para cada grupo de ratas Long-Evans de -16 a 0 horas de la fase I para la producción de orina. La figura 19(C) muestra el efecto de la infusión IV con relaxina de tipo silvestre sobre los hematocritos. La figura 19(D) muestra el efecto de la infusión IV con relaxina de tipo silvestre sobre el BUN plasmático en ratas Long-Evans hembra. La figura 19(E) muestra el consumo de agua para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase I. La figura 19(F) muestra la producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase I.
- 45 La Figura 20, partes (A) - (I) muestra los datos de la fase II después de la administración de vehículo (grupo de control) y los grupos de prueba con administración de 0,1X, 0,3X y 1X de una variante de 20K PEG-Relaxina con sustitución en la cadena A en la posición 1 con pAF unido a PEG del Ejemplo 43. La figura 20(A) muestra el efecto sobre el consumo de agua y la producción de orina. La figura 20(B) muestra el efecto sobre los niveles de sodio en plasma para cada grupo de ratas Long-Evans después de la inyección. La figura 20(C) muestra el efecto sobre los niveles de cambio de sodio en plasma para cada grupo de ratas Long-Evans después de la inyección. La figura 20(D) muestra el efecto de PEG-Relaxina sobre la osmolaridad plasmática. La figura 20(E) muestra el efecto de la infusión IV con PEG-Relaxina sobre el cambio en la osmolaridad plasmática. La figura 20(F) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre los niveles de BUN. La figura 20(G) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre el consumo de agua para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase II. La figura 20(H) muestra el valor de referencia de producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de -16 a 0 horas de la fase II. La figura 20(I) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre la producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase II.

DEFINICIONES

- 50 Se entenderá que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las construcciones y los reactivos particulares descritos en el presente documento y como tal puede variar. También se entenderá que se emplea la terminología utilizada en el presente documento con la finalidad de describir las realizaciones particulares solamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención, el cual solo se verá limitado por las reivindicaciones adjuntas.
- 55 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una "relaxina" o un "polipéptido de relaxina" y diversas formas con guion y sin guion es una referencia a una o más de tales proteínas e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.
- 60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente les asigna el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para ejecutar o probar la invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y las patentes mencionadas en el presente documento se hacen referencia con el fin de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que podrían usarse con relación a la invención actualmente descrita. Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento se interpretará como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otro motivo.

5 La frase "sustancialmente purificado" se refiere a un polipéptido de relaxina que puede estar sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína tal como se encuentra en su entorno natural, es decir, una célula nativa o una célula hospedadora en el caso de polipéptidos de relaxina producidos por recombinación. El polipéptido de relaxina que puede estar sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, menos de 10 aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido de relaxina o una variante del mismo se produce por recombinación por las células hospedadoras, la proteína puede estar presente en aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % o menos de 15 del peso seco de las células. Cuando el polipéptido de relaxina o una variante del mismo se produce por recombinación por las células hospedadoras, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo en aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 4 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 10 mg/l o aproximadamente 1 mg/l o menos del peso seco 20 de las células. Por lo tanto, el polipéptido de relaxina "sustancialmente purificado" según se produce a través de los métodos de la presente invención puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, específicamente, un nivel de pureza de al menos 25 aproximadamente el 75 %, el 80 %, el 85 % y más específicamente, un nivel de pureza de al menos 30 aproximadamente el 90 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 95 %, un nivel de pureza de al menos 35 aproximadamente el 99 % o mayor según se determina a través de los método apropiados, por ejemplo el análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

35 Una "célula hospedadora recombinante" o "célula hospedadora" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del método utilizado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, apareamiento f u otros métodos conocidos en la técnica para crear células hospedadoras recombinantes. El polinucleótido exógeno se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido o, alternativamente, puede estar integrado en el genoma del hospedador.

40 Como se usa en el presente documento, el término "medio" o "medios" incluye cualquier medio de cultivo, solución, sólido, semisólido, o soporte rígido que pueda apoyar o contener cualquier célula hospedadora, incluyendo células hospedadoras bacterianas, células hospedadoras de levadura, células hospedadoras de insectos, células hospedadoras de plantas, células hospedadoras eucariotas, células hospedadoras mamíferas, células CHO, células hospedadoras procariotas, células hospedadoras *E. coli* o *Pseudomonas* y contenidos de células. Por lo tanto, el término puede comprender un medio en el cual la célula hospedadora se haya cultivado, por ejemplo, un medio en el cual el polipéptido de relaxina se haya secretado, incluso un medio ya sea antes o después de una etapa de proliferación. El término también puede comprender tampones o reactivos que contienen lisados de células hospedadoras, por ejemplo en el caso donde el polipéptido de relaxina se produce intracelularmente y las células hospedadoras se lisan o se alteran para liberar el polipéptido de relaxina.

45 "Agente reductor", como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en el estado reducido y reduce los enlaces disulfuro intramolecular o intermolecular. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a, ditiotreitol (DTT), 2- mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteamina (2- aminoetanol) y glutatión reducido. Es fácilmente evidente para el experto en la materia que una amplia gama de agentes reductores son adecuados para el uso en los métodos y composiciones de la presente invención.

50 "Agente oxidante", como se usa en el presente documento con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que es capaz de eliminar un electrón de un compuesto que se está oxidando. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, entre otros, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitol oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Es fácilmente evidente para el experto en la materia que una amplia gama de agentes oxidantes son adecuados para el uso en los métodos de la presente invención.

55 "Agente desnaturalizante" o "desnaturalizador", como se usa en el presente documento, se define como cualquier compuesto o material que provocará un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente

desnaturalizante o desnaturalizador se determinará mediante las propiedades y la concentración del agente desnaturalizante o desnaturalizador particular. Los agentes desnaturalizantes o desnaturalizadores pueden ser caótropos, detergentes, disolventes orgánicos, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos o una combinación de dos o más tales agentes. Los caótropos adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea, guanidina y tiocianato de sodio.

5 Los detergentes útiles pueden incluir, pero no se limitan a, detergentes fuertes, tales como dodecil sulfato sódico, o éteres de polioxetileno (por ejemplo Detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes no iónicos suaves (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves, tales como N->2,3-(Dioleoxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo colato sódico o desoxicolato sódico) o detergentes zwitteriónicos incluyendo, pero no limitado a, sulfobetaínas (Zwittergent), 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS) y 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO). Los disolventes orgánicos, miscibles en agua, por ejemplo acetonitrilo, los alcanoles inferiores (especialmente alcanoles C2-C4, tales como etanol o isopropanol) o los alcanoídeos inferiores (especialmente alcanoídeos C2-C4, tales como etilenglicol) se pueden utilizar como desnaturalizadores. Los fosfolípidos útiles en la presente invención pueden ser fosfolípidos naturales, tales como fosfatidiletanamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados o variantes de fosfolípidos sintéticos, tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

10 “Replegamiento”, como se usa en el presente documento, describe cualquier proceso, reacción o método que transforma el enlace disulfuro que contiene polipéptidos de un estado indebidamente plegado o desplegado a una conformación natural o plegada correctamente con respecto a los enlaces disulfuro.

15 20 “Coplegamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere específicamente al proceso de replegamiento, las reacciones o los métodos que emplean al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y producen la transformación de los polipéptidos indebidamente plegados o desplegados a polipéptidos naturales, plegados correctamente.

25 El término “proinsulina”, como se usa en el presente documento, es una proteína debidamente cruzada de fórmula:

B-C-A

30 en donde:

A es la cadena A de la relaxina o un derivado funcional de la misma;

B es la cadena B de la relaxina o un derivado funcional de la misma que tienen un grupo .épsilon.-amino; y

35 C es el péptido conector de proinsulina. Preferentemente, proinsulina es la cadena A de la relaxina humana, la cadena B de la relaxina humana y C es el péptido conector natural. Cuando la proinsulina es la secuencia natural, la proinsulina contiene tres grupos amino libres: Fenilalanina (1) (grupo .alfa.-amino), Lisina(29) (grupo .épsilon.-amino) y Lisina(64) (grupo .épsilon.-amino).

40 La frase “análogo de relaxina”, como se usa en el presente documento, es una proteína debidamente cruzada que presenta la actividad de la relaxina de fórmula:

A-B

45 en donde:

A es la cadena A de la relaxina o un derivado funcional de la cadena A de la relaxina; y

B es la cadena B de la relaxina o un derivado funcional de la cadena B de la relaxina que tiene un grupo .épsilon.-amino y al menos una de A o B contiene una modificación de aminoácidos de la secuencia natural.

50 En la presente memoria descriptiva, cada vez que se utiliza el término relaxina en un sentido plural o genérico pretende comprender las insulinas naturales y los análogos de relaxina y sus derivados. Por “polipéptido de relaxina”, como se usa en el presente documento, se entiende un compuesto que tiene una estructura molecular similar a la de la relaxina humana que incluye los puentes disulfuro entre Cys.sup.A7 y Cys.sup.B7 y entre Cys.sup.A20 y Cys.sup.B19 y un puente disulfuro interno entre Cys.sup.A6 y Cys.sup.A11, y que tiene actividad de la relaxina.

55 El término “relaxina”, como se usa en el presente documento, se refiere a la relaxina humana, cuya secuencia de aminoácidos y estructura espacial son bien conocidas. La relaxina humana consta de una cadena A de veintiún aminoácidos y una cadena B de treinta aminoácidos que están reticuladas por enlaces disulfuro. Una relaxina debidamente reticulada contiene tres puentes disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A y la posición 19 de la cadena B y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A [Nicol, D.S.H.W. y Smith, L. F., Nature, 187, 483-485 (1960)].

60 65 Los péptidos de la relaxina incluyen, pero no se limitan a, relaxina, humana; relaxina, porcina; IGF-I, humana; factor de crecimiento II (69-84) similar a la relaxina; factor de crecimiento II (68-102) similar a la prorrelaxina, humana; factor de crecimiento II (105-128) similar a la prorrelaxina, humana; [AspB28]-relaxina, humana; [LysB28]-relaxina,

humana; [LeuB28]-relaxina, humana; [ValB28]-relaxina, humana; [AlaB28]-relaxina, humana; [AspB28, ProB29]-relaxina, humana; [LysB28, ProB29]-relaxina, humana; [LeuB28, ProB29]-relaxina, humana; [ValB28, ProB29]-relaxina, humana; [AlaB28, ProB29]-relaxina, humana; [GlyA21]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3]-relaxina, humana; [AlaA21]-relaxina, humana; [AlaA21 Gin.sup.B3] relaxina, humana; [GlnB3]-relaxina, humana; [GlnB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GluB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; [GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; B22-B30 relaxina, humana; B23-B30 relaxina, humana; B25-B30 relaxina, humana; B26-B30 relaxina, humana; B27-B30 relaxina, humana; B29-B30 relaxina, humana; la cadena A de la relaxina humana y la cadena B de la relaxina humana.

- 5 10 La frase “análogo de relaxina” significa una proteína que tiene una cadena A y una cadena B que tienen sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que la cadena A o la cadena B de la relaxina humana, respectivamente, pero se difieren de la cadena A y la cadena B de la relaxina humana al tener una o más eliminaciones de aminoácidos, uno o más reemplazos de aminoácidos o una o más adiciones de aminoácidos que no destruyen la actividad de relaxina del análogo de relaxina. Un tipo de análogo de relaxina es un análogo de relaxina que tiene un punto isoeléctrico que es “superior a” el punto isoeléctrico de la relaxina. Otro tipo de análogo de relaxina es un “análogo de relaxina monomérico”.

15 20 Un “análogo de relaxina monomérico” es un análogo de acción rápida de la relaxina humana, incluyendo, por ejemplo, relaxina humana donde Pro en la posición B28 se sustituye con Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y donde Lys en la posición B29 es Lys o se sustituye con Pro. Otro análogo de relaxina monomérico, también conocido como relaxina humana des(B27), es relaxina humana donde Thr en la posición 27 de la cadena B se elimina. Los análogos de relaxina monoméricos se describen en Chance, R. E., y col., patente de EE.UU. N.º 5.514.646, emitida el 7 de mayo de 1996; Brems, D.N., y col. Protein Engineering, 5, 527-533 (1992); Brange, J.J.V., y col., publicación EPO N.º 214.826 (publicada el 18 de marzo de 1987); y Brange, J.J.V., y col., Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940 (1991). Los análogos de relaxina monoméricos empleados en las presentes formulaciones están debidamente reticulados en las mismas posiciones que en la relaxina humana.

25 30 Los péptidos de la relaxina incluyen, pero no se limitan a, relaxina, humana; relaxina, porcina; IGF-I, humana; factor de crecimiento II(69-84) similar a la relaxina; factor de crecimiento II (68-102) similar a la prorrelaxina, humana; factor de crecimiento II (105-128) similar a la prorrelaxina, humana; [AspB28]-relaxina, humana; [LysB28]-relaxina, humana; [LeuB28]-relaxina, humana; [ValB28]-relaxina, humana; [AlaB28]-relaxina, humana; [AspB28, ProB29]-relaxina, humana; [LysB28, ProB29]-relaxina, humana; [LeuB28, ProB29]-relaxina, humana; [ValB28, ProB29]-relaxina, humana; [AlaB28, ProB29]-relaxina, humana; [GlyA21]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3]-relaxina, humana; [AlaA21]-relaxina, humana; [AlaA21 Gin.sup.B3] relaxina, humana; [GlnB3]-relaxina, humana; [GlnB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GluB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; [GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; B22-B30 relaxina, humana; B23-B30 relaxina, humana; B25-B30 relaxina, humana; B26-B30 relaxina, humana; B27-B30 relaxina, humana; B29-B30 relaxina, humana; la cadena A de la relaxina humana y la cadena B de la relaxina humana.

40 45 55 En un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes que codifican las proteínas variantes, vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos variantes, células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos variantes y/o vectores de expresión, y métodos para producir las proteínas variantes. En un aspecto adicional, la invención proporciona tratar un trastorno que responde a la relaxina mediante la administración a un paciente de una proteína variante, habitualmente con un vehículo farmacéutico, en una cantidad terapéuticamente eficaz. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para modular la inmunogenicidad (particularmente reduciendo la inmunogenicidad) de los polipéptidos de relaxina alterando los epítopos de MHC Clase II.

60 65 La frase “polipéptido de relaxina” también incluye las sales y los profármacos farmacéuticamente aceptables, y los profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros de la relaxina de tipo silvestre así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas de la relaxina de tipo silvestre y las fusiones de polipéptidos de la misma. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el amino terminal, en el carboxilo terminal, o en ambos, están comprendidas en la frase “polipéptido de relaxina”. Las fusiones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, metionil relaxina en donde una metionina está enlazada al extremo amino terminal de la relaxina a causa de la expresión recombinante de la forma madura de relaxina que carece de la porción o péptido señal o líder de la misma (una metionina está unida al extremo amino terminal de relaxina causa de la expresión recombinante), fusiones con el fin de purificación (incluyendo, pero no limitado a, para poli-histidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas, por ejemplo albúmina sérica. La patente de EE.UU. N.º 5.750.373 describe un método para seleccionar nuevas proteínas, tales como la hormona de crecimiento y las variantes de fragmentos de anticuerpos que tienen propiedades de unión alteradas por sus moléculas del receptor respectivas. El método comprende la fusión de un gen que codifica una proteína de interés al dominio del carboxilo terminal de la proteína de recubrimiento del gen III del fago filamentoso M13. Las moléculas químéricas comprenden relaxina y otra u otras moléculas. La molécula químérica puede contener regiones o fragmentos específicos de una o ambas de la relaxina y las otras moléculas. Cualquiera de tales fragmentos se puede preparar a partir de proteínas a través de métodos bioquímicos convencionales o mediante la expresión de un

polinucleótido que codifica el fragmento. La relaxina, o un fragmento de la misma, se pueden producir como una proteína de fusión que comprende albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés), Fc o una porción de la misma. Tales construcciones de fusión son adecuadas para mejorar la expresión de la relaxina, o fragmento de la misma, en una célula hospedadora eucariota. Porciones de HSA a modo de ejemplo incluyen el polipéptido del terminal N (aminoácidos 1-369, 1-419 y longitudes intermedias que comienzan con el aminoácido 1), según se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.766.883 y la publicación WO 97/24445. Otros polipéptidos químéricos pueden incluir una proteína de HSA con relaxina, o fragmentos de la misma, unida a cada uno de los extremos C-terminal y N-terminal de la HSA. Las construcciones de HSA se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.876.969. Otras fusiones se pueden crear mediante la fusión de relaxina con a) la porción Fc de una inmunoglobulina; b) un análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina; y c) fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina.

Diversas referencias desvelan la modificación de polipéptidos mediante la conjugación o glucosilación de polímeros. La frase "polipéptido de relaxina" incluye polipéptidos conjugados a un polímero tal como PEG y puede comprender una o más derivaciones adicionales de cisteína, lisina u otros restos. Además, el polipéptido de relaxina puede comprender un enlazador o polímero, donde el aminoácido al que se conjuga el enlazador o polímero puede ser un aminoácido no natural de acuerdo con la presente invención, o se puede conjugar a un aminoácido codificado natural utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo el acoplamiento a lisina o cisteína.

La frase "polipéptido de relaxina" también incluye relaxina glucosilada, tal como pero no limitado a, polipéptidos glucosilados en cualquier posición de los aminoácidos, formas glucosiladas del polipéptido unidas a N o unidas a O. Las variantes que contienen cambios de nucleótido único también se consideran variantes del polipéptido de relaxina biológicamente activas. Además, también se incluyen variantes de corte y empalme. La frase "polipéptido de relaxina" también incluye heterodímeros, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros del polipéptido de relaxina de uno o más de los polipéptidos de relaxina o cualquier otro polipéptido, proteína, carbohidrato, polímero, molécula pequeña, enlazador, ligando u otra molécula biológicamente activa de cualquier tipo, unida mediante medios químicos o expresada como una proteína de fusión, así como análogos de polipéptido, por ejemplo, eliminaciones u otras modificaciones específicas que siguen manteniendo la actividad biológica.

La frase "polipéptido de relaxina" o "relaxina" abarca los polipéptidos de relaxina que comprenden una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Los polipéptidos de relaxina de la presente invención pueden comprender modificaciones con uno o más aminoácidos naturales junto con una o más modificaciones de aminoácidos no naturales. Se han descrito las sustituciones a modo de ejemplo en una amplia gama de posiciones de aminoácidos en los polipéptidos de relaxina de tipo silvestre, incluyendo, pero no limitado a, sustituciones que modulan la estabilidad farmacéutica, que modulan una o más de las actividades biológicas del polipéptido de relaxina, por ejemplo, entre otros, aumentar la actividad agonista, aumentar la solubilidad del polipéptido, disminuir la susceptibilidad de la proteasa, convertir el polipéptido en un antagonista, etc. y están comprendidas en la frase "polipéptido de relaxina". En algunas realizaciones, el antagonista de relaxina comprende un aminoácido codificado de modo no natural enlazado a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión al receptor de la molécula de relaxina.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que modula la actividad biológica del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que modula la actividad antivírica del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que mejora la actividad antivírica del polipéptido de relaxina. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular una o más propiedades o actividades de la relaxina. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular la afinidad por el receptor de relaxina, modular la vida media circulante, modular la vida media terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión por proteasas, modular la dosis, modular la liberación o la biodisponibilidad, facilitar la purificación o mejorar o alterar una vía de administración particular. De igual modo, los polipéptidos de relaxina pueden comprender secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión al anticuerpo (incluyendo, pero no limitado a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en la afinidad (incluyendo, pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas enlazadas (incluyendo, pero no limitado a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero no limitado a, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

La frase "polipéptido de relaxina" también comprende homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que están unidos, incluyendo, pero no limitado a, los unidos directamente mediante cadenas laterales de aminoácidos codificados de modo no natural, ya sea a la misma cadena o diferente cadena lateral de aminoácidos codificados de modo no natural, a las cadenas laterales de aminoácidos codificados naturales o indirectamente mediante un enlazador. Algunos enlazadores a modo de ejemplo incluyendo, entre otros, pequeños compuestos orgánicos, polímeros solubles en agua de diversas longitudes como poli(etilenglicol) o polidextrano, o polipéptidos de diversas longitudes.

Un "aminoácido codificado de modo no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otras frases que se pueden utilizar como sinónimo de la frase "aminoácido codificado de modo no natural" son "aminoácido no natural" y sus versiones diversas con guion y sin guion. La frase

5 "aminoácido codificado de modo no natural" también incluye, pero no se limita a, los aminoácidos que se producen mediante la modificación (por ejemplo modificaciones postraduccionales) de un aminoácido codificado natural (incluyendo, pero no limitado a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no están naturalmente incorporados en una cadena de polipéptidos creciente por el complejo de traducción. Algunos ejemplos de tales aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina o O-fosfotirosina.

10 Un "grupo de modificación del extremo amino terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al extremo amino terminal de un polipéptido. De forma similar, un "grupo de modificación del extremo carboxilo terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al extremo carboxilo terminal de un polipéptido. Los grupos de modificación de los extremos terminales incluyen, entre otros, varios polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua como la albúmina sérica u otras fracciones que aumentan la vida media sérica de los péptidos.

15 15 Las frases "grupo funcional", "fracción activa", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente activo" y "fracción químicamente activa" se utilizan en la técnica y en el presente documento para hacer referencia a porciones o unidades diferentes definibles de una molécula. Las frases son un tanto sinónimos en las técnicas químicas y se utilizan en el presente documento para indicar las porciones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

20 20 El término "enlace" o "enlazador" se usa en el presente documento para hacer referencia a los grupos o enlaces que normalmente se forman como el resultado de una reacción química y normalmente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua en valores de pH útiles, incluyendo, pero no limitado a, en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, incluso durante un tiempo indefinido. Enlaces degradables o hidrolíticamente inestables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluso, por ejemplo, sangre. Enlaces degradables o enzimáticamente inestables significa que el enlace se puede degradar por una o más enzimas. Tal como se entiende en la técnica, PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura polimérica o en el grupo enlazador entre la estructura polimérica y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados mediante la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con los grupos alcohol en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces degradables hidrolíticamente incluyen, pero no se limitan a, enlaces carbonato; enlaces imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster de fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el 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 ortoéster que son el producto de la reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amino, incluyendo, pero no limitado a, en un extremo de un polímero como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces de oligonucleótidos formados por un grupo fosforamidita, incluyendo, pero no limitado a en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

40 40 La frase "molécula biológicamente activa", "fracciones biológicamente activas" o "agente biológicamente activo" cuando se utiliza en el presente documento significa cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción referente a un organismo, incluyendo, pero no limitado a, virus, bacterias, bacteriófagos, transposición, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en el presente documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, entre otros, cualquier sustancia destinada para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o para mejorar por otra parte el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, entre otros, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, vacunas, inmunógenos, fármacos duros, fármacos blandos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicos, tinturas, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótido, toxoides, toxinas, células procariotas y eucariotas, virus, polisacáridos, ácidos nucleicos y porciones de este obtenidos o derivados de virus, bacterias, insectos, animales o cualquier otra célula o tipo de célula, liposomas, micropartículas y micelas. Los polipéptidos de relaxina se pueden añadir en una formulación micelar; véase patente de EE.UU. N.º 5.833.948. Clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para el uso con la invención incluyen, entre otros, fármacos, profármacos, radionúclidos, agentes de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes anti-tumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos, toxinas derivadas de microbios y similares.

60 60 Un "polímero bifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales discretos que pueden reaccionar específicamente con otras fracciones (incluyendo, pero no limitado a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un enlazador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un componente biológicamente activo particular y otro grupo reactivo con un grupo en un segundo componente biológico, se puede utilizar para formar un conjugado que incluye el primer componente biológicamente activo, el enlazador bifuncional y el segundo componente biológicamente activo. Se conocen muchos procesos y moléculas enlazadoras para la unión de varios compuestos a los péptidos. Véase, por ejemplo, solicitud de patente europea N.º 188.256; patentes estadounidense N.º 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales

discretos que pueden reaccionar específicamente con otras fracciones (incluyendo, pero no limitado a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede ser de cualquier longitud o peso molecular deseado y se puede seleccionar para proporcionar una distancia o conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas a la relaxina y su receptor o relaxina.

Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, igualmente comprenden los sustituyentes químicos idénticos que derivarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura CH₂O es equivalente a la estructura -OCH₂.

El término "sustituyentes" incluye, entre otros, "sustituyentes que no interfieren". Los "sustituyentes que no interfieren" son los grupos que producen compuestos estables. Radicales o sustituyentes que no interfieren adecuados incluyen, pero no se limitan a, halo, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, araquilo C₁-C₁₂, alcarilo C₁-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalquenilo C₃-C₁₂, fenilo, fenilo sustituido, toluoilo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C₂-C₁₂, alcoxiarilo C₂-C₁₂, ariloxialquilo C₇-C₁₂, oxiarilo C₇-C₁₂, alquilsulfonilo C₁-C₆, alquilsulfonilo C₁-C₁₀, -(CH₂)_m -O-(alquilo C₁-C₁₀) en donde m de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radicales heterocílicos, radicales heterocílicos sustituidos, nitroalquilo, -N₀₂, -CN, -NRC(O)-(alquilo C₁-C₁₀), -C(O)- (alquilo C₁-C₁₀), alquilo tioalquilo C₂-C₁₀, -C(O)O-(alquilo C₁-C₁₀), -OH, -SO₂, =S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀)-CF₃, -C(O)-CF₃, -C(O)NR₂, -(arilo C₁-C₁₀)-S-(arilo C₆-C₁₀), -C(O)-(arilo C₁-C₁₀), -(CH₂)_m -O-(alquilo-(CH₂)_m-O-C₁-C₁₀) en donde cada m es de 1 a 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos y similares. Cada R, como se usa en el presente documento, es H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, aralquilo o alcarilo.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

El término "alquilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, un radical hidrocarbonado cílico o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturados y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopentilmetilo, homólogos e isómeros, por ejemplo, de n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más doble enlaces o triple enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3- (1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", excepto que se indique lo contrario, también se entiende que incluye los derivados de alquilo definidos más detalladamente a continuación, por ejemplo "heteroalquilo". Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo".

El término "alquileno", por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alcano, según se muestra, entre otros, en las estructuras -CH₂CH₂- y -CH₂CH₂CH₂CH₂- y además incluye los grupos descritos a continuación como "heteroalquileno". normalmente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá entre 1 y 24 átomos de carbono y los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono son una realización particular de los métodos y composiciones descritas en el presente documento. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquileno o alquilo de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalquilo) se utilizan en sus sentidos convencionales y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", por sí solo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, un radical hidrocarbonado cílico o una combinación de estos, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar, opcionalmente, oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar, opcionalmente, cuaternizado. Los heteroátomos O, N, S y Si pueden estar ubicados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)2-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, por ejemplo -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De igual modo, el término "heteroalquileno", por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de heteroalquilo, según se muestra, entre otros, en -CH₂-CH₂-S-CH₂ CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂- Para los grupos heteroalquileno, el mismo heteroátomo o diferentes heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos terminales de la cadena (incluyendo, pero no limitado a, alquilenoxi, alquilendioxilo, alquilenamino, alquilediamina, aminoalquileno y similares). Además, para los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, ninguna orientación del grupo de enlace está implícita en la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula -C(O)2R: representa ambas -C(O)2R' y -R'C(O)2.

- Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí solos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces de anillos saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Adicionalmente, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquil incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Adicionalmente, el término comprende estructuras de anillos bicíclicos y tricíclico. De igual modo, el término "heterocicloalquileno" por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de heterocicloalquilo y el término "cicloalquileno" por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de cicloalquilo.
- Como se usa en el presente documento, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. El enlace de los polímeros solubles en agua a los polipéptidos de relaxina puede producir cambios, incluyendo, pero no limitado a, vida media sérica aumentada o modulada o vida media terapéutica aumentada o modulada con respecto a la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas como la agregación y formación de multímeros, unión al receptor alterada, unión alterada a una o más parejas de unión y dimerización o multimerización del receptor alterada. El polímero soluble en agua puede tener o no tener su propia actividad biológica y se puede utilizar como un enlazador para unir la relaxina a otras sustancias, incluyendo, pero no limitado a, uno o más polipéptidos de relaxina o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, sus derivados mono Cl-C10 alcoxi o ariloxi (descritos en la patente de EE.UU. N. °5.252.714, monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliaminoácidos, divinil éter anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropil)- metacrilamida, dextrano, derivados del dextrano, incluso dextrano sulfato, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glucanos, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo, pero no limitado a, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, ésteres de poliviniletil y alfa-beta-polí[(2- hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o sus mezclas. Ejemplos de los polímeros solubles en agua incluyen, entre otros, polietilenglicol y albúmina sérica.
- Como se usa en el presente documento, el término "polialquilenglicol" o "poli(alquenglicol)" se refiere a polietilenglicol(poli(etilenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol y sus derivados. El término "polialquilenglicol" comprende ambos polímeros, lineal y ramificado y pesos moleculares promedio de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Se mencionan otras realizaciones a modo de ejemplo, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, por ejemplo el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).
- El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado, aromático, que puede ser de anillo único o de múltiples anillos (incluyendo, pero no limitado a, de 1 a 3 anillos) que se fusionan o se unen por enlace covalente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están, opcionalmente, oxidados y los átomos de nitrógeno está, opcionalmente, cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no exhaustivos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolil y 6-quinolil. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.
- Para abreviar, el término "arilo" cuando se utiliza en combinación con otros términos (incluyendo, pero no limitado a, ariloxi, ariltioxi, arilalcilo) incluye ambos anillos, aril y heteroarilo como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" implica incluir los radicales en los cuales un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluyendo, pero no limitado a, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluyen los grupos alquilo en los cuales un átomo de carbono (incluyendo, pero no limitado a, un grupo metileno) se ha reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (incluyendo, pero no limitado a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).
- Cada uno de los términos anteriores (incluyendo, pero no limitado a, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") implican incluir ambas formas, sustituidas y no sustituidas del radical indicado. A continuación se proporcionan sustituyentes a modo de ejemplo para cada tipo de radical.
- Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluso los grupos que suelen denominarse alquieno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalcilo, cicloalquenilo, y

heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de varios grupos seleccionados de, entre otros: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R'R", OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR'C(O)NR'R", -NR"C(O)2R' -NR-C(NR'R'R")=NR", NR C(NR'R")=NR", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN y —NO2 en un número que oscila entre cero y (2m',+1), en donde m' es el número total de átomos

5 de carbono en el radical. R', R", R"" cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido, incluyendo, pero no limitado a, arilo sustituido con halógenos 1-3, alquilo sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R' R", R" y R"" cuando más de uno de estos grupos está presente.

10 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" implica incluir, entre otros, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del análisis de sustituyentes anterior, el experto en la materia entenderá que el término "alquilo" implica incluir 15 grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquilo (incluyendo, pero no limitado a, -CF3 y -CH2CF3) y acilo (incluyendo, pero no limitado a, -C(O)CH3, -C(O)CF3, -C(O)CH2OCH3 y similares).

15 Al igual que los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo varían y se seleccionan, entre otros, de: halógeno, OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR' -halógeno, -SiR'R'R", OC(O)R', -C(O)R', CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR'C(O)NR'R", -NR"C(O)2R', NR-C(NR'R'R")=NR", NR C(NR'R")=NR", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN y -NO2, -R', -N3, -CH(Ph)2, 20 fluoro(C1-C4)alcoxi y fluoro(C1-C4)alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos; y en donde R', R", R"" se seleccionan de manera independiente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, aril y heteroarilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R' R", R" y R"" cuando más de uno de estos grupos está presente.

25 Como se usa en el presente documento, el término "vida media sérica modulada" significa el cambio positivo o negativo en la vida media circulante de una relaxina modificada con respecto a su forma no modificada. La vida media sérica se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo después de la administración de 30 relaxina y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración sérica con el tiempo permite el cálculo de la vida media sérica. La vida media sérica aumentada preferentemente tiene al menos aproximadamente el doble, pero puede ser útil un aumento más pequeño, por ejemplo en donde permite un régimen de dosificación satisfactorio o evita un efecto tóxico. En algunas realizaciones, el aumento es al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces o al menos aproximadamente diez veces.

35 La frase "vida media terapéutica aumentada", como se usa en el presente documento, significa el cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de relaxina, con respecto a su forma no modificada. La vida media terapéutica se mide midiendo las propiedades de farmacocinéticas o farmacodinámicas 40 de la molécula en diversos puntos de tiempo después de la administración. La vida media terapéutica aumentada preferentemente permite un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total particular beneficiosa o evita un efecto no deseado. En algunas realizaciones, la vida media terapéutica aumentada resulta de la potencia aumentada, o de la unión aumentada o disminuida de la molécula modificada a su diana, ruptura aumentada o 45 disminuida de la molécula por las enzimas como proteasas, o un aumento o disminución en otros parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada o un aumento o disminución en la supresión de la molécula mediada por el receptor.

50 El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína está libre de al menos algunos de los componentes celulares con los cuales está asociado en el estado natural, o que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semi-seco, o en solución, incluyendo, pero no limitado a, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se determinan, normalmente, utilizando técnicas químicas analíticas como electroforesis en gel de 55 poliacrilamida o cromatografía por tamaño de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa a partir de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína diferente del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína producen sustancialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, puede implicar que el ácido nucleico o proteína tenga al menos el 85 % de pureza, al menos el 90 % de pureza, al menos el 95 % de pureza, al menos el 99 % o más de pureza.

60 El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y sus polímeros, ya sea en forma de cadena única o cadena doble. A menos que se limite específicamente, el término comprende los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de un modo similar al de los nucleótidos naturales. A menos que se limite específicamente de otra manera, el término también se

refiere a análogos del oligonucleótido, incluso PNA (ácido nucleico peptídico), análogos de ADN utilizando en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos específica también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservativa (incluyendo, pero no limitado a, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias así como también la secuencia explícitamente indicada. En particular, las sustituciones de codón degenerado pueden lograrse al generar secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones (o todos) se sustituye con una base mezclada y/o restos de desoxiinosina (Batzer y colaboradores, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

- 5 10 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma alternativa para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de proteína y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos naturales así como polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más restos de aminoácidos es un aminoácido codificado de modo no natural. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier extensión, incluyendo las proteínas de longitud completa, donde los restos de aminoácidos se unen a partir de enlaces peptídicos covalentes.

15 20 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturales son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tales como, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, L-aminoácidos proteogénicos naturales; D-aminoácidos, aminoácidos modificados químicamente tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos naturales tales como β-alanina, ornitina, etc.; y compuestos sinterizados químicamente que tienen 25 30 propiedades conocidas en la técnica por ser características de los aminoácidos. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, α-metil aminoácidos (por ejemplo, α-metilanina), D-aminoácidos, aminoácidos de tipo histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina y α-metil-histidina), aminoácidos que tienen un metíleno extra en la cadena lateral ("homo" aminoácidos) y aminoácidos en los cuales un grupo funcional ácido carboxílico en la cadena lateral se reemplaza por un grupo ácido 35 40 sulfónico (por ejemplo, ácido cistéico). La incorporación de aminoácidos no naturales, incluyendo aminoácidos no naturales sintéticos, aminoácidos sustituidos, o uno o más D-aminoácidos en las proteínas de la presente invención puede ser beneficiosa de varias maneras diferentes. Los péptidos que contienen D-aminoácidos, etc., presentan estabilidad aumentada *in vitro* o *in vivo* en comparación con las contrapartes que contienen L-aminoácidos. Por lo tanto, la construcción de péptidos, etc., que incorpora D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se 45 deseja o requiere mayor estabilidad intracelular. Más específicamente, los péptidos D, etc., son resistentes a las proteasas y peptidasas endógenas, proporcionando así biodisponibilidad mejorada de la molécula y vidas útiles prolongadas *in vivo* cuando tales propiedades son deseables. Adicionalmente, los péptidos D, etc., no se pueden procesar de manera eficaz para una representación restringida por la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad a las células T auxiliares y, por lo tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en todo el organismo.

50 Los aminoácidos se pueden denominar en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o bien por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Los nucleótidos, también, se pueden denominar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

55 60 65 "Variantes modificadas conservativamente" se aplica a las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos específicas, "variantes modificadas conservativamente" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degradación del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en donde una alanina se especifica por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Las variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. El experto en la materia reconocerá que cada codón es un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para la metionina, y TGG, que es comúnmente el único codón para triptófano) se pueden modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Como para las secuencias de aminoácidos, un experto en la materia reconocerá que las sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservativamente" en donde la alteración produce la supresión de un aminoácido, la adición de un

5 aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas para los expertos en la materia. Las variantes modificadas de forma conservativa son en adición y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

10 Las tablas de sustitución conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas para los expertos en la materia. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 15 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);
 20 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 25 (Diciembre 1993).

25 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, aproximadamente el 60 % de identidad, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, 30 aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 % de identidad sobre una región específica), cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada según lo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para las personas entendidas en la técnica) o mediante la alineación manual y la inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir sobre una región que es al menos aproximadamente de 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o sobre una región que es de 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, en donde no se especifica, a lo largo de toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos de otra especie que no sea la humana, se puede obtener a través de un proceso que comprende las etapas de selección de 40 una genoteca en condiciones estrictas de hibridación con una sonda marcada que tiene una secuencia de polinucleótido de la invención o un fragmento de la misma, y aislando ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen la secuencia de polinucleótidos. Tales técnicas de hibridación se conocen por los expertos en la materia.

45 Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, para la cual las secuencias de prueba se compran. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y prueba se introducen en un ordenador, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si fuera necesario, y los parámetros del programa de algoritmos de secuencia se designan. Se pueden utilizar los parámetros predeterminados del programa o, alternativamente, se pueden designar los parámetros. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidades de las secuencias para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

55 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye una referencia a un segmento de cualquiera de la cantidad de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de entre 20 y 600, de forma habitual aproximadamente 50 y aproximadamente 200, más de forma habitual aproximadamente 100 y aproximadamente 150 en donde una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de que dos secuencias se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son conocidos para los expertos en la materia. Se puede realizar una alineación óptima de secuencias para la comparación, incluyendo, pero no limitado a, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda de un método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 85:2444, mediante la implementación computarizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante la alineación manual y la inspección visual (véase, por ejemplo, 60 Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento 1995)).

- Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de las secuencias y la similitud de las secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2,0, que se describen en Altschul y col. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information disponible en la red mundial ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST normalmente se realiza con el filtro de "baja complejidad" apagado.
- 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 similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de la prueba al ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, o es inferior a aproximadamente 0,01 o es inferior a aproximadamente 0,001.
- La frase "selectivamente (o específicamente) se hibrida a" se refiere a la unión, duplexación o hibridación de una molécula solamente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones estrictas de hibridación cuando la secuencia está presente en una mezcla compleja (incluyendo, pero no limitado a, total celular o biblioteca de ADN o ARN).
- La frase "condiciones estrictas de hibridación" se refiere a hibridación de las secuencias de ADN, ARN, APN u otras imitaciones de ácidos nucleicos, o combinaciones de las mismas en condiciones de fuerza iónica baja y alta temperatura como se conoce en la técnica. normalmente, en condiciones estrictas una sonda se hibridará a su subsecuencia diana en una mezcla de complejo de ácido nucleico (incluyendo, pero no limitado a, total celular o biblioteca de ADN o ARN) pero no se hibrida a otras secuencias en la mezcla de complejo. Las condiciones estrictas son dependientes de las secuencias y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa para la hibridación de los ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology— Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays"* (1993). Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan para ser aproximadamente 5-10 °C menor que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica en un pH de fuerza iónica definido. El T_m es la temperatura (en fuerza iónica definida, pH y concentración nucleica) en la cual el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio (mientras las secuencias diana estén presentes in exceso, en T_m , el 50 % de las sondas se pueden ocupar en equilibrio). Las condiciones estrictas pueden ser en las cuales la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion de sodio, normalmente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion de sodio (u otras sales) en pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (incluyendo, pero no limitado a, de 10 a 50 nucleótidos) y en al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (incluyendo, pero no limitado a, más que 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces de fondo, opcionalmente 10 veces hibridación de fondo. Las condiciones estrictas de hibridación a modo de ejemplo pueden ser de la siguiente manera: 50 % de formamida, 5X SSC, y 1 % SDS, incubación a 42 °C, o 5X SSC, 1 % SDS, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2X SSC, y 0,1 % SDS a 65 °C. Los lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos.
- Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético *Eucarya* tales como animales (incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluyendo, pero no limitado a, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.
- Como se usa en el presente documento, la frase "no eucariota" se refiere a organismos no eucariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético *Eubacteria* (incluyendo, pero no limitado a, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, etc.) o el dominio filogenético *Archaea* (incluyendo, pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* como especies *Haloferax volcanii* y *Halobacterium NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, etc.).
- El término "sujeto" como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en algunas realizaciones un mamífero, y en otras realizaciones un ser humano, que es el objeto del tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

La frase "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de polipéptido de aminoácidos no naturales modificados que se está administrando que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. Las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificados descrito en el presente documento se pueden administrar para tratamientos profiláctico, de mejora o terapéutico.

El término "mejorar" o "potenciar" significa aumentar o prolongar ya sea en potencia o duración un efecto deseado. Por lo tanto, con respecto a mejorar el efecto de los agentes terapéuticos, el término "mejorar" se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una "cantidad eficaz potenciadora" como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para mejorar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado. Cuando se utilizan en un paciente, las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la terapia anterior, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante.

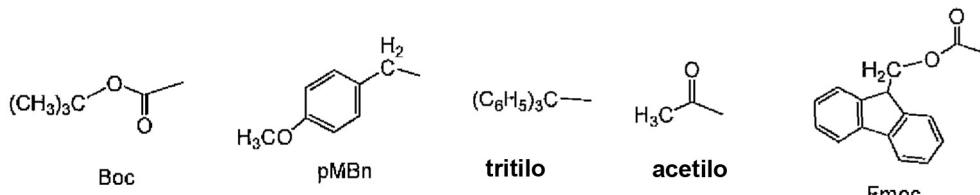
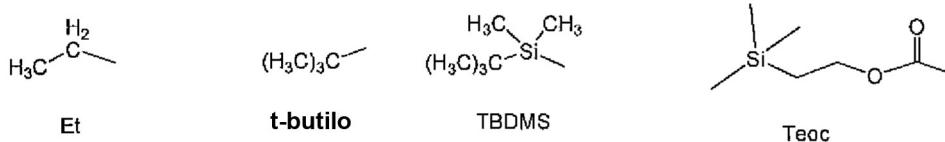
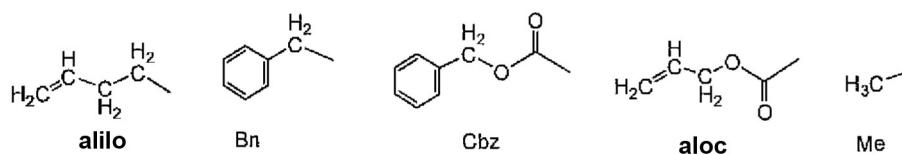
El término "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cambio hecho a un polipéptido determinado, por ejemplo cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación cotraduccional o la modificación postraduccional de un polipéptido. El término con forma "(modificado)" significa que los polipéptidos establecidos están, opcionalmente, modificados, es decir, los polipéptidos en discusión se pueden modificar o no modificar.

La frase "modificado postraduccionalmente" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se le realiza al aminoácido después de ser incorporado en una cadena de polipéptidos. El término abarca, solamente a modo de ejemplo, las modificaciones cotraduccionales *in vivo*, (por ejemplo en un sistema de traducción libre de células), modificaciones postraduccionales *in vivo* y las modificaciones postraduccionales *in vitro*.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que tienen el polipéptido de relaxina se administran a un paciente susceptible o que de otro modo corre riesgo de una enfermedad, trastorno o afección particular. Se define que la cantidad es una "cantidad profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas también dependen del estado de salud del paciente, el peso y similares. Se considera bien para el experto en la materia determinar las cantidades profilácticamente eficaces mediante la experimentación de rutina (por ejemplo, un ensayo clínico de dosificación en escalas).

El término "protegido" se refiere a la presencia de un "grupo protector" o porción que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar del grupo de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector can be ortopiridildisulfido. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, por ejemplo ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un grupo bencilo o un grupo alquilo como metilo, etilo o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también se pueden utilizar en los métodos o con los métodos y composiciones descritos en el presente documento, incluso grupos fotolábiles como Nvoc y MeNvoc. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también se pueden utilizar en los métodos o con los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Solamente a modo de ejemplo, los grupos de bloqueo/protectores se pueden seleccionar de:



Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, que se incorpora al presente por referencia en su totalidad.

- 5 En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificados se administran a un paciente que ya sufre una enfermedad, afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Se define que la cantidad es una "cantidad terapéuticamente eficaz" y dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la terapia anterior, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Se considera bien para el experto en la materia determinar las cantidades terapéuticamente eficaces mediante la experimentación de rutina (por ejemplo, un ensayo clínico de dosificación en escalas).
- 10 15 Los polipéptidos de relaxina de la presente invención se pueden utilizar para modular la vasoconstricción, la producción de NO, ET-1, Ang II, y la agregación plaquetaria. En algunos casos, un paciente que necesita la recibe una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuiría la vasoconstricción del paciente sobre el valor de referencia de su tratamiento deseado por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %. También se desvela un método de tratamiento de un paciente que lo necesita para aumentar la producción de NO del paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido de relaxina para aumentar la producción de NO por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %.
- 20 25 30 35 40 Se desvela un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuye la agregación plaquetaria del paciente por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %. También se desvela un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina para disminuir la hipertrofia. En otra realización de la presente invención se desvela un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuye la síntesis de proteínas estimulada por CF por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %. También se desvela un método de tratamiento de un paciente que lo necesita para aumentar la expresión de ANP del paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido de relaxina para aumentar la producción de NO por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %. Los presente métodos en los cuales una peg-relaxina de la presente invención tiene un aumento de 10 veces en AUC en comparación con un aumento de 15 veces de relaxina de tipo silvestre; aumento de más de 15 veces; aumento de 20 veces; aumento de más de 20 veces; aumento de 25 veces; aumento de más de 25 veces; aumento de 30 veces; aumento de más de 30 veces; aumento de 35 veces; aumento de más de 35 veces; aumento de 40 veces; aumento de más de 40 veces; aumento de 45 veces; aumento de más de 45 veces; aumento de 50 veces;

aumento de más de 50 veces; aumento de 55 veces; aumento de más de 55 veces; aumento de 60 veces; aumento de más de 60 veces; aumento de 65 veces; aumento de más de 65 veces; aumento de 70 veces; aumento de más de 70 veces; aumento de 75 veces; aumento de más de 75 veces; aumento de 80 veces; aumento de más de 80 veces; aumento de 85 veces; aumento de más de 85 veces; aumento de 90 veces; aumento de más de 90 veces; aumento de 95 veces; aumento de más de 95 veces; aumento de 100 veces; aumento de más de 100 veces.

5 El término "tratar" se utiliza para hacer referencia a tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

10 Los polipéptidos de aminoácido codificado de modo no natural presentados en el presente documento pueden incluir compuestos marcados isotópicamente con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferentes de la masa atómica o número másico habitualmente encontrados en la naturaleza. Algunos ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógenos, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, por ejemplo 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 35S, 18F, 36Cl, respectivamente. Determinados compuestos marcados isotópicamente descritos en el presente documento, 15 por ejemplo en los cuales se incorporan los isótopos radioactivos como 3H y 14C, pueden ser útiles en los ensayos de distribución de tejidos del sustrato o fármaco. Además, la sustitución por isótopos como deuterio, es decir, 2H, puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas a causa de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos.

20 Todos los isómeros, incluyendo, pero no limitado a, diastereómeros, enantiómeros, y mezclas de los mismos se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento. En realizaciones adicionales u otras realizaciones, los polipéptidos de aminoácido codificado de modo no natural se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se utiliza para producir un efecto deseado, incluyendo 25 un efecto terapéutico deseado. En realizaciones adicionales u otras realizaciones hay metabolitos activos de polipéptidos de aminoácido codificado de modo no natural.

30 En algunas situaciones, los polipéptidos de aminoácido codificado de modo no natural pueden existir como tautómeros. Además, los polipéptidos de aminoácido codificado de modo no natural descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol y similares. También se consideran las formas solvatadas para describirse en el presente documento. Los expertos en la materia reconocerán que algunos de los compuestos en el presente documento pueden existir de diversas formas tautoméricas. Todas las formas tautoméricas se consideran como parte de las composiciones descritas en el presente documento.

35 A menos que se indique lo contrario, se emplean los métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica.

40 **Descripción detallada**

40 **I. Introducción**

45 En el presente documento se desvelan polipéptidos de relaxina que comprenden al menos un aminoácido no natural. En ciertos casos, el polipéptido de relaxina con al menos un aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraduccional. En un caso, la al menos una modificación postraduccional comprende una unión de una molécula, incluyendo, pero no limitado a, un marcador, un tinte, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotoreticulante, un radionúclido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metal, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una porción que contiene metal, una porción radioactiva, un nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa covalentemente o no covalentemente con otras moléculas, una porción fotoliberadora, una porción excitabile por radiación actínica, una porción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, 50 una porción que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente redox activo, un aminotioácido, una porción tóxica, un grupo marcado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosorescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable, que comprende un segundo grupo reactivo con al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo, utilizando metodología química, conocida para el experto en la materia, adecuada para los grupos reactivos particulares. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es una porción alquinilo (incluyendo, pero no limitado a, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina, en donde el grupo propargilo también se denomina a veces como porción acetileno) y el 55 segundo grupo reactivo es una porción azido y se utilizan las metodologías químicas de cicloadición [3+2]. En otro caso, el primer grupo reactivo es una porción que comprende un anillo de tres miembros que contiene un grupo reactivo, y el segundo grupo reactivo es una porción que comprende un anillo de tres miembros que contiene un grupo reactivo.

ejemplo, el primer grupo reactivo es la porción azido (incluyendo, pero no limitado a, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la porción alquinilo. En determinadas realizaciones del polipéptido de relaxina modificado de la presente invención, se utiliza al menos un aminoácido no natural (incluyendo, pero no limitado a, aminoácido no natural que contiene un grupo funcional ceto) que comprende al menos una modificación postraduccional, en donde la o las modificaciones postraduccionales comprenden una porción sacárida. En determinadas realizaciones, la modificación postraduccional se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariota. Un enlazador, polímero, polímero soluble en agua u otra molécula pueden unir la molécula al polipéptido. La molécula puede estar unida directamente al polipéptido.

- 5 10 En ciertos casos, la proteína incluye al menos una modificación postraduccional que se realiza *in vivo* por una célula hospedadora, en donde la modificación postraduccional no se realiza normalmente por otro tipo de célula hospedadora. En ciertos casos, la proteína incluye al menos una modificación postraduccional que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, en donde la modificación postraduccional no se realiza normalmente por una célula no eucariota. Algunos ejemplos de modificaciones postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, 15 acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión de glucolípidos y similares.

20 En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados de modo no natural para la glucosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de enlace de glucolípidos del polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados de modo no natural para la glucosilación del polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados naturales para la glucosilación, acetilación, 25 acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de enlace de glucolípidos del polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados naturales para la glucosilación del polipéptido.

30 En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación del polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más eliminaciones que mejoran la glucosilación del polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más eliminaciones que mejoran la glucosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de 35 aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación en un aminoácido codificado de modo no natural en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación en un aminoácido codificado natural en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados naturales que mejoran la glucosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de 40 aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación en un aminoácido codificado natural en el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones y/o sustituciones de aminoácidos codificados de modo no natural que mejoran la glucosilación en un aminoácido codificado de modo no natural en el polipéptido.

45 En un caso, la modificación postraduccional comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (incluyendo, pero no limitado a, en donde el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)2-Man-GlcNAc-GlcNAc y similares). En otro caso, la modificación postraduccional comprende la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero no limitado a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por un enlace GalNAc-serina, un enlace GalNAc-treonina, un enlace GlcNAc-serina o un enlace GlcNAc-treonina. En ciertos casos, una proteína o polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítopos, una etiqueta FLAG, una etiqueta polihistidina, una fusión GST y/o similares. Algunos ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, pero no se limitan a, una secuencia señal de secreción procariota, una secuencia señal de secreción eucariota, una secuencia señal de secreción eucariota optimizada en 5' para expresión bacteriana, una secuencia señal de secreción nueva, una secuencia señal de secreción de pectato liasa, secuencia señal de secreción de Omp A y una secuencia señal de secreción de fago. Algunos ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, pero no se limitan a, STII (procariota), Fd GIII y M13 (fago), Bg12 (levadura) y la secuencia señal bla derivada de un transposón. Cualquiera de estas secuencias se puede modificar para proporcionar un resultado deseado con el polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, sustituyendo una secuencia señal por una secuencia señal diferente, sustituyendo una secuencia líder por una secuencia líder diferente, etc.

60 65 La proteína o polipéptido de interés puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o diez o más aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales pueden ser los mismos o diferentes, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. En ciertos casos, al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en una versión natural de la proteína se sustituye por un aminoácido no natural.

Se desvelan en el presente documento métodos y composiciones basándose en la relaxina que comprenden al menos un aminoácido codificado de modo no natural. La introducción de al menos un aminoácido codificado de modo no natural en la relaxina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que comprenden reacciones químicas específicas, incluyendo, pero no limitado a, con uno o más aminoácidos codificados de modo no natural cuando no reacciona con los 20 aminoácidos habituales. En algunos casos, la relaxina que comprende los aminoácidos codificados de modo no natural está enlazada a un polímero soluble en agua, por ejemplo polietilenglicol (PEG), mediante la cadena lateral del aminoácido codificado de modo no natural. Se desvela en el presente documento un método altamente eficiente para la modificación selectiva de proteínas con derivados de PEG, que implica la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente, incluyendo, pero no limitado a, los aminoácidos que contienen grupos funcionales o sustituyentes que no se encuentran en los 20 aminoácidos que se incorporan naturalmente, incluyendo, pero no limitado a, una cetona, una porción azida o acetileno, en proteínas en respuesta a un codón selector y la posterior modificación de esos aminoácidos con un derivado de PEG adecuadamente reactivo. Una vez incorporadas, las cadenas laterales de aminoácidos luego se pueden modificar utilizando metodologías químicas conocidas por los expertos en la materia como adecuadas para los grupos funcionales particulares o sustituyentes presentes en el aminoácido codificado de modo no natural. Las metodologías químicas conocidas de una amplia gama son adecuadas para el uso en la presente divulgación para incorporar un polímero soluble en agua en la proteína. Tales metodologías incluyen, pero no se limitan a, una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, por ejemplo, Padwa, A. in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y Huisgen, R. en *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) con, incluso entre otros, derivados de acetileno o azida, respectivamente.

Debido a que el método de cicloadición de Huisgen [3+2] implica una cicloadición en lugar de una reacción de sustitución nucleofílica, las proteínas se pueden modificar con selectividad extremadamente alta. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad ($1,4 > 1,5$) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornoe, y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; y Rostovtsev, y col., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; y documento WO 03/101972. Una molécula que se puede añadir a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un grupo funcional adecuado o sustituyente, incluyendo, pero no limitado a, un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo acetileno, incluyendo, pero no limitado a, p-propargiloxifenilalanina o grupo azido, incluyendo, pero no limitado a, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

El anillo de cinco miembros que resulta de la cicloadición de Huisgen [3+2] generalmente no es reversible en ambientes de reducción y es estable contra la hidrólisis durante períodos prolongados en ambientes acuosos. Por consiguiente, las características físicas y químicas de una amplia variedad de sustancias se pueden modificar en condiciones acuosas exigentes con los derivados de PEG activos de la presente invención. Resulta aún más importante, debido a que las fracciones azida y acetileno son específicas entre sí (y, por ejemplo, no reaccionan con cualquiera de los aminoácidos 20 comunes codificados genéticamente), las proteínas se pueden modificar en uno o más sitios específicos con selectividad extremadamente alta.

También se desvelan en el presente documento derivados de PEG solubles en agua e hidrolíticamente estables y polímeros hidrófobos relacionados que tienen una o más fracciones acetileno o azida. Los derivados del polímero PEG que contienen fracciones acetileno son altamente selectivos para acoplarse con fracciones azida que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector. De igual modo, los derivados del polímero PEG que contienen fracciones azida son altamente selectivos para acoplarse con fracciones acetileno que se han introducido selectivamente en proteínas en respuesta a un codón selector.

Más específicamente, las fracciones azida comprenden, entre otros, alquilazidas, arilazidas y derivados de estas azidas. Los derivados de las alquil y las aril azidas pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de acetileno. Las fracciones acetileno comprenden alquil y aril acetilenos y derivados de cada. Los derivados de los alquil y los aril acetilenos pueden incluir otros sustituyentes siempre que se mantenga la reactividad específica de azida.

Se desvela en el presente documento conjugados de sustancias que tienen una amplia diversidad de grupos funcionales, sustituyentes o fracciones, con otras sustancias, incluyendo, pero no limitado a, un marcador; un tinte; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotoentrecedor; un radionucleido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metal; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo; una porción que contiene metal; una porción radioactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa por enlace covalente o no covalente con otras moléculas; una porción fotoliberadora; una porción excitable por radiación actínica; una porción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una porción que incorpora un átomo pesado;

un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente de reducción activo; un aminotioácido; una porción tóxica; un grupo etiquetado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforecente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrodenso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. También se desvelan en el presente documento conjugados de sustancias que tienen fracciones azida o acetileno con derivados del polímero PEG que tienen las fracciones acetileno o azida correspondientes. Por ejemplo, un polímero PEG que contienen una porción azida se pueden acoplar a una molécula biológicamente activa en una posición en la proteína que contiene un aminoácido no codificado genéticamente que tiene una funcionalidad de acetileno. El enlace por el cual el PEG y la molécula biológicamente activa están acoplados incluye, entre otros, el producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

Está bien establecido en la técnica que se puede utilizar PEG para modificar las superficies de los biomateriales (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 6.610.281; Mehvar, R., J. Pharm Sci., 3(1): 125-136 (2000)). También se desvelan en el presente documento biomateriales que comprenden una superficie que tienen uno o más sitios azida o acetileno reactivos y uno o más de los polímeros que contienen azida o acetileno de la invención acoplados a la superficie mediante el enlace de cicloadición de Huisgen [3+2]. Los biomateriales y otras sustancias también se pueden acoplar a los derivados del polímero activados por la azida o acetileno a través de un enlace distinto del enlace de azida o acetileno, por ejemplo a través de un enlace que comprende un ácido carboxílico, amina, alcohol o porción tiol, para dejar la porción azida o acetileno disponible para las reacciones posteriores.

Se devela en el presente documento un método para sintetizar los polímeros de la divulgación que contienen azida y acetileno. En el caso del derivado de PEG que contiene azida, la azida puede estar enlazada directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene azida se puede preparar mediante la unión de un agente de enlace que tiene una porción azida en un extremo terminal a un polímero convencional activado de modo que el polímero resultante tienen la porción azida en su extremo terminal. En el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, el acetileno puede estar enlazado directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene acetileno se puede preparar mediante la unión de un agente de enlace que tiene una porción acetileno en un extremo terminal a un polímero convencional activado de modo que el polímero resultante tienen la porción acetileno en su extremo terminal.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene azida, un polímero soluble en agua que tiene al menos una porción hidroxilo activa experimenta una reacción para producir un polímero sustituido que tienen una porción más reactiva, por ejemplo un mesilato, tresilato, tosilato o grupo saliente de halógeno, en el mismo. Los expertos en la materia conocen la preparación y el uso de derivados de PEG que contienen haluros de ácidos sulfonilo, átomos de halógeno y otros grupos salientes. El polímero sustituido resultante luego experimenta una reacción para sustituir la porción más reactiva por una porción azida en el extremo terminal del polímero. Alternativamente, un polímero soluble en agua que tiene al menos una porción activa nucleofílica o electrofílica experimenta una reacción con un agente de enlace que tiene una azida en un extremo terminal para que se forme un enlace covalente entre el polímero PEG y el agente de enlace y la porción azida se ubica en el extremo terminal del polímero. Los expertos en la materia conocen las fracciones nucleofílica y electrofílica, incluso aminas, tioles, hidrazidas, hidrazinas, alcoholes, carboxilatos, aldehídos, cetonas, tioésteres y similares.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, un polímero soluble en agua que tiene al menos una porción hidroxilo activa experimenta una reacción para desplazar un halógeno u otro grupo saliente activado de un precursor que contienen una porción acetileno. Alternativamente, un polímero soluble en agua que tiene al menos una porción activa nucleofílica o electrofílica experimenta una reacción con un agente de enlace que tiene un acetileno en un extremo terminal para que se forme un enlace covalente entre el polímero PEG y el agente de enlace y la porción acetileno se ubica en el extremo terminal del polímero. El uso de fracciones halógenas, grupo saliente activado, fracciones nucleofílica y electrofílica en el contexto de la síntesis orgánica y la preparación y uso de los derivados de PEG están establecidos para los expertos en la materia.

También se desvela en el presente documento un método para la modificación selectiva de proteínas para añadir otras sustancias a la proteína modificada, incluyendo, pero no limitado a, polímeros solubles en agua como PEG y derivados de PEG que contienen una porción azida o acetileno. Se pueden utilizar derivados de PEG que contienen azida y acetileno para modificar las propiedades de las superficies y moléculas en donde la biocompatibilidad, la estabilidad, la solubilidad y la falta de inmunogenicidad son importantes, proporcionando al mismo tiempo un medio más selectivo de unión de los derivados de PEG a las proteínas del que se conocía previamente en la técnica.

60 **Métodos de ácidos nucleicos recombinantes generales para su uso con la invención**

En numerosas realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de relaxina de interés se aislarán, se clonarán y con frecuencia se alterarán utilizando métodos recombinantes. Tales realizaciones se utilizan, incluyendo, pero no limitado a, para la expresión de la proteína o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión u otras secuencias derivadas de un polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, las secuencias que codifican los polipéptidos de la invención están unidas funcionalmente a un

promotor heterólogo.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural se puede sintetizar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido original, incluyendo, pero no limitado a, con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y luego cambiando la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o retirada (es decir, eliminación o sustitución) del resto o restos de aminoácidos relevantes. La secuencia de nucleótidos se puede modificar de forma conveniente a través de mutagénesis de sitio dirigido de acuerdo con los métodos convencionales. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se puede preparar a través de síntesis química, incluyendo, pero no limitado a, utilizando un sintetizador oligonucleótido, en donde los oligonucleótidos se diseñan basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y, preferentemente, seleccionando los codones que son favorecidos en la célula hospedadora en la cual se producirá el polipéptido recombinante.

La presente invención utiliza técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los métodos de uso generales en la presente invención incluyen Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3^a ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., 1994)).

Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular incluyen Berger y Kimrnel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y col., Molecular Cloning A Laboratory Manual (2a Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. Y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado hasta 1999) ("Ausubel")). Estos textos describen la mutagénesis, el uso de vectores, promotores y muchos otros temas relevantes relacionados, incluyendo, pero no limitado a, la generación de genes o polinucleótidos que incluyen codones selectores para la producción de proteínas que incluyen aminoácidos no naturales, ARNt ortogonales, sintetasas ortogonales y pares de los mismos.

Diversos tipos de mutagénesis se utilizan en la invención para diversos fines, incluyendo, pero no limitado a, para producir sintetasas nuevas o ARNt, para mutar moléculas de ARNt, para mutar polinucleótidos que codifican sintetasas, para producir genotecas de ARNt, para producir bibliotecas de sintetasas, para producir codones selectores, para insertar codones selectores que codifican aminoácidos no naturales en una proteína o polipéptido de interés. Incluyen, entre otros, mutagénesis de sitio dirigido, de punto aleatorio, recombinación homóloga, reordenamiento de ADN u otros métodos de mutagénesis recurrente, construcción químérica, mutagénesis que utiliza uracilo que contiene plantillas, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada por fosforotioato, mutagénesis que utiliza ADN doble con huecos o similares, mutagénesis mediada por PCT, o cualquier combinación de estos. Métodos adecuados adicionales incluyen reparación de mal apareamiento puntual, mutagénesis que utiliza cepas de huésped deficientes en la reparación, selección mutagénesis por selección de restricción y restricción de purificación, mutagénesis de supresión, mutagénesis por una síntesis genética total, reparación de rupturas de cadena doble y similares. En la presente invención también se incluyen mutagénesis, incluyendo, pero no limitado a, que implica construcciones químéricas. En una realización, la mutagénesis puede estar guiada por información conocida de la molécula natural o molécula natural alterada o mutada, incluyendo, pero no limitado a, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, estructura cristalina o similares.

Los textos y ejemplos que se encuentran en el presente describen estos procesos. Existe información adicional en las siguientes publicaciones y referencias citadas en: Ling y col., Approaches to DNA mutagenesis; an overview, *Anal Biochem.* 254(2):157-178 (1997); Dale y col., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, *In vitro mutagenesis*, *Ann, Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F, y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel y col., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass y col., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor y col., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor y col., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers y col., 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers y col., Strand specific cleavage of

phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer y col., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441- 9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer y col., Improved enzymatic 5 *in vitro* reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz y col., Oligonucleotide- directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions *in vitro*, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer y col., Different 10 base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch- repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter y col., Improved oligonucleotide site- directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 15 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells y col., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar y col., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar y Khorana, Total 20 synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells y col., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundström y col., Oligonucleotide- directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific 25 mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, y col., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); e, I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995). Los detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores se pueden encontrar en *Methods in Enzymology* Volumen 154, que también describe controles útiles para la resolución de problemas con diversos métodos de mutagénesis.

Los oligonucleótidos, por ejemplo, para su uso en la mutagénesis de la presente invención, por ejemplo, mutar bibliotecas de sintetasas, o alterar ARNt, normalmente se sinterizan químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita de fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, 30 (1981) por ejemplo, usando un sintetizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter y col., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168 (1984).

La invención también se refiere a células hospedadoras eucariotas, células hospedadoras no eucariotas y organismos para la incorporación *in vivo* de un aminoácido no natural mediante los pares ARNt/RS ortogonales. Las células hospedadoras se modifican genéticamente (incluyendo, pero no limitado a, se transforman, se transducen o 35 se transfecstan) con los polinucleótidos de la invención o construcciones que incluyen un polinucleótido de la invención, incluyendo, pero no limitado a, un vector de la invención, que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. Por ejemplo, las regiones codificantes para el ARNt ortogonal, la sintetasa ortogonal ARNt y la proteína que deriva están unidos funcionalmente a los elementos de control de la expresión genética que son funcionales en la célula hospedadora deseada. El vector puede estar, por ejemplo, en la forma de 40 un plásmido, un cósmido, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en las células o microorganismos a través de métodos convencionales que incluyen electroporación (Fromm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985)), infección por vectores víricos, penetración balística de alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico, ya sea dentro de la matriz de perlas o partículas pequeñas o en la superficie (Klein y col., *Nature* 327, 70-73 (1987)) o similares. Las técnicas 45 adecuadas para la transferencia del ácido nucleico en las células *in vitro* incluyen el uso de liposomas, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación de con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia genética *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, la transfección con vectores víricos (típicamente retrovíricos) y proteína de recubrimiento vírica-transfección mediada por liposoma [Dzau y col., *Trends in Biotechnology* 11:205-210 (1993)]. En algunas situaciones puede ser deseable proporcionarle a la fuente de ácido 50 nucleico un agente que apunte a las células diana, por ejemplo un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean los liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie de la célula asociada con endocitosis para apuntar o para facilitar la absorción, por ejemplo de proteínas de la cápside o fragmentos de estas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que 55 experimentan la internalización en el ciclo, proteínas que apuntan la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular.

Las células hospedadoras modificadas genéticamente se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para las actividades como, por ejemplo, exploración de etapas, activación de 60 promotores o selección de transformantes. Opcionalmente, estas células se pueden cultivar en organismos transgénicos. Otras referencias útiles, incluyendo, pero no limitado a, para aislamiento y cultivo celular (por ejemplo, para el aislamiento posterior de un ácido nucleico) incluyen Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas allí; Payne y col. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Varios métodos conocidos de introducción de ácidos nucleicos diana en células están disponibles, cualquiera de los cuales puede usarse en la invención. Estos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo con proyectiles e infección con vectores víricos (planteados a continuación), etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen construcciones de ADN de la presente invención. Las bacterias se cultivan hasta la fase logarítmica y los plásmidos dentro de las bacterias se pueden aislar por diversos métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, están disponibles en el mercado kits para la purificación de plásmidos a partir de bacterias, (véase, por ejemplo, EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene; y, 5 QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan adicionalmente para producir otros plásmidos, se utilizan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. 10 Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencia que permite la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, 15 o ambos (incluyendo, pero no limitado a, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véase, Gillam & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, y col., Nature, 328:731 (1987); Schneider, E., y col., Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (mencionados anteriormente). Se 20 proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonación, por ejemplo, por la ATCC, por ejemplo, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna y col. (eds) publicado por la ATCC. Los procesos básicos adicionales para la secuenciación, la clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes también se encuentran en Watson y col. (1992) Recombinant DNA Second 25 Edition Scientific American Books, NY. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, tanto convencional como no convencional) puede pedirse de forma personalizada o convencional en cualquiera de diversas fuentes comerciales, tales como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX disponible en línea en mcrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA disponible en línea en genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL disponible en línea en expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras.

30 CODONES SELECTORES

Los codones selectores de la invención expanden el marco de codones genéticos de la maquinaria biosintética de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, pero no se limita a, un codón de tres bases único, un codón sin sentido, por ejemplo un codón de parada, incluyendo, pero no limitado a, un codón ámbar (UAG), un codón ocre, o un codón ópalo (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro o más bases, un codón raro o similares. Es fácilmente evidente para el experto en la materia que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que se pueden introducir en un gen o polinucleótido deseado, incluyendo, pero no limitado a, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de un único polinucleótido que codifica al menos una parte del polipéptido de relaxina. Es fácilmente evidente para el experto en la materia que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que se pueden introducir en un gen o polinucleótido deseado, incluyendo, pero no limitado a, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más total encontrado en las secuencias de polinucleótidos de 35 cadena A y de cadena B que codifican al menos una parte del polipéptido de relaxina.

40 En una realización, los métodos implican el uso de un codón selector que es un codón de parada para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales *in vivo*. Por ejemplo, se produce un O-ARNt que reconoce el codón de parada, incluyendo, pero no limitado a, UAG, y se aminoacila por una O-RS con un aminoácido no natural deseado. Este O-ARNt no se reconoce por las aminoacil-ARNt sintetasas del huésped natural. Se puede utilizar mutagénesis de sitio dirigido convencional para introducir el codón de parada, incluyendo, pero no limitado a, TAG, 45 en el sitio de interés en un polipéptido de interés. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., y col. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 16:791-802. Cuando la O-RS, O-ARNt y el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés se combinan *in vivo*, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para proporcionar un polipéptido que contiene el aminoácido no natural en la 50 posición especificada.

55 La incorporación de aminoácidos no naturales *in vivo* se puede realizar sin perturbación significativa de la célula hospedadora eucariota. Por ejemplo, debido a que la eficacia de supresión del codón UAG depende de la competencia entre el O-ARNt, incluyendo, pero no limitado a, el ARNt supresor ámbar y un factor de liberación eucariota (incluyendo, pero no limitado a, eRF) (que se une a un codón de parada e inicia la liberación del péptido creciente del ribosoma), la eficacia de supresión se puede modular, incluyendo, pero no limitado a, aumentando el nivel de O-ARNt o el ARNt supresor.

60 Los aminoácidos no naturales también se pueden codificar con codones raros. Por ejemplo, cuando la concentración de arginina en una reacción de síntesis de proteína *in vitro* se reduce, el codón de arginina raro, AGG, ha resultado ser eficaz para la inserción de Ala por un ARNt sintético acilado con alanina. Véase, por ejemplo, Ma y col., Biochemistry, 32:7939 (1993). En este caso, el ARNt sintético compite con el tRNAArg natural, que existe como una

especie minoritaria en *Escherichia coli*. Algunos organismos no utilizan todos los codones tripletes. Un codón no asignado a AGA en *Micrococcus luteus* se ha utilizado para la inserción de aminoácidos en un extracto de transcripción/traducción *in vitro*. Véase, por ejemplo, Kowal y Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997). Los componentes de la presente invención se pueden generar para utilizar estos codones raros *in vivo*.

5 Los codones selectores también compren codones extendidos, incluyendo, pero no limitado a, codones de cuatro o más bases, como codones de cuatro, cinco, seis o más bases. Ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, entre otros, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, entre otros, AGGAC, CCCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC y similares. Una característica de la invención incluye utilizar 10 codones extendidos basados en supresión de desplazamiento de fase. Se pueden insertar codones de cuatro o más bases, incluyendo, pero no limitado a, uno o múltiples aminoácidos no naturales en la misma proteína. Por ejemplo, en presencia de O-ARNt mutados, incluyendo, pero no limitado a, un ARNt supresor de desplazamiento de fase especial, con bucles anticodónicos, por ejemplo, con bucles anticodónicos de al menos 8-10 nt, el codón de cuatro o más bases se lee como un solo aminoácido. En otras realizaciones, los bucles anticodónicos pueden descodificar, 15 incluyendo, pero no limitado a, al menos un codón de cuatro bases, al menos un codón de cinco bases, al menos un codón de seis bases o más. Debido a que hay 256 posibles codones de cuatro bases, se pueden codificar múltiples aminoácidos no naturales en la misma célula usando un codón de cuatro o más bases. Véase, Anderson y col., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" 20 Four-base Codons with a Library Approach in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol. 307: 755-769.

Por ejemplo, se han utilizado codones de cuatro bases para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas usando métodos biosintéticos *in vitro*. Véase, por ejemplo, Ma y col., (1993) Biochemistry, 32:7939; y Hohsaka y col., 25 (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34. Se utilizaron CGGG y AGGU para incorporar simultáneamente 2-naftilalanina y un derivado de NBD de lisina en estreptavidina *in vitro* con dos ARNt supresores de desplazamiento de fase químicamente acilados. Véase, por ejemplo, Hohsaka y col., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194. En un estudio *in vivo*, Moore y col. examinaron la capacidad de los derivados de tRNA^{Leu} con anticodones NCUA para suprimir codones UAGN (N puede ser U, A, G o C) y descubrieron que el cuadruplete UAGA se puede descodificar por un ARNt^{Leu} con un anticodón UCUA con una eficacia del 13 al 26 % con poca descodificación en la fase 0 o -1. Véase, 30 Moore y col., (2000) J. Mol. Biol., 298:195. En una realización, se pueden utilizar codones extendidos basados en codones raros o codones sin sentido en la presente invención, que pueden reducir la lectura en sentido equivocado y la supresión de desplazamiento de fase en otros sitios no deseados.

35 Para un sistema dado, un codón selector también puede incluir uno de los codones de tres bases naturales, en los que el sistema endógeno no utiliza (o utiliza pocas veces) el codón de base natural. Por ejemplo, esto incluye un sistema que no tienen un ARNt que reconozca el codón de tres bases natural o un sistema en el que el codón de tres bases es un codón raro.

40 Los codones selectores incluyen opcionalmente pares de bases no naturales. Adicionalmente, estos pares de bases no naturales expanden el alfabeto genético existente. Un par de bases extra aumenta la cantidad de codones tripletes de 64 a 125. Las propiedades de pares de tercera base incluyen emparejamiento de bases estable y selectivo, la incorporación enzimática eficaz en ADN con alta fidelidad por una polimerasa y la extensión de cebador continuada eficaz después de la síntesis del par de bases no naturales naciente. Las descripciones de pares de bases no naturales que se pueden adaptar para los métodos y composiciones incluyen, por ejemplo, Hirao, y col., 45 (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182. Véase, también, Wu, Y., y col., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630. A continuación se enumeran otras publicaciones relevantes.

50 Para su uso *in vivo*, el nucleósido no natural es permeable a membrana y se fosforila para formar el trifosfato correspondiente. Además, la información genética aumentada es estable y no se destruye por enzimas celulares. Los intentos anteriores de Benner y otros aprovecharon los patrones de enlaces de hidrógeno que son diferentes de los de los pares de Watson-Crick canónicos, el ejemplo más notable de ellos el par iso-C:iso-G. Véase, por ejemplo, Switzer y col., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322; y Piccirilli y col., (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602. Estas bases en general se emparejan de forma errónea en cierto grado con bases naturales y no 55 se pueden replicar de forma enzimática. Kool y colaboradores demostraron que las interacciones de empaquetamiento hidrófobo entre bases pueden reemplazar los enlaces de hidrógeno para dirigir la formación de pares de bases. Véase, Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602; y Guckian y Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825. En un esfuerzo por desarrollar un par de bases no natural que satisfaga todos los requisitos anteriores, Schultz, Romesberg y colaboradores han sintetizado sistemáticamente y estudiado una serie de bases hidrófobas no naturales. Se ha descubierto que un autopar PICS:PICS es más estable que los pares de bases naturales y se puede incorporar de manera eficaz en el ADN por el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* (KF). Véase, por ejemplo, McMinn y col., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6; y Ogawa y col., 60 (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274. Un autopar 3MN:3MN se puede sinterizar por KF con eficacia y selectividad suficientes para la función biológica. Véase, por ejemplo, Ogawa y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803. Sin embargo, ambas bases actúan como un terminador de cadena para replicación adicional. Recientemente se ha desarrollado un DNA polimerasa mutante que se puede utilizar para replicar el autopar PICS. Además, un autopar 65

7AI se puede replicar. Véase, por ejemplo, Tae y col., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439. Un nuevo par de metalobases, Dipic:Py, también se ha desarrollado, que forma un par estable tras su unión con Cu(II). Véase, Meggers y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714. Debido a que los codones extendidos y los codones no naturales son intrínsecamente ortogonales a los codones naturales, los métodos de la invención pueden aprovechar esta propiedad para generar ARNt ortogonales para ellos.

5 También se puede utilizar un sistema de derivación traduccional para incorporar un aminoácido no natural en un polipéptido deseado. En un sistema de derivación traduccional, se incorpora una secuencia grande en un gen pero no se traduce en proteínas. La secuencia contiene una estructura que sirve como una señal para inducir al ribosoma 10 para que salte la secuencia y reanude la traducción cadena abajo de la inserción.

15 En determinadas realizaciones, la proteína o polipéptido de interés (o parte del mismo) en los métodos y/o composiciones de la invención se codifica por un ácido nucleico. normalmente, el ácido nucleico comprende al menos un codón selector, al menos dos codones selectores, al menos tres codones selectores, al menos cuatro codones selectores, al menos cinco codones selectores, al menos seis codones selectores, al menos siete codones 20 selectores, al menos ocho codones selectores, al menos nueve codones selectores, diez o más codones selectores.

25 Los genes que codifican proteínas o polipéptidos de interés se pueden mutagenizar utilizando métodos conocidos para el experto en la materia y que se describen en el presente documento para incluir, por ejemplo, uno o más codones selectores para la incorporación de un aminoácido no natural. Por ejemplo, un ácido nucleico para una proteína de interés se mutageniza para incluir uno o más codones selectores, lo que posibilita la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales. La invención incluye cualquiera de las variantes, incluyendo, pero no limitado a, versiones mutantes de cualquier proteína, por ejemplo, incluyendo al menos un aminoácido no natural. De igual modo, la invención también incluye ácidos nucleicos correspondientes, es decir, cualquier ácido nucleico con uno o más codones selectores que codifican uno o más aminoácidos no naturales.

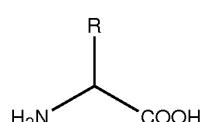
30 Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de interés como un polipéptido de relaxina se pueden mutar fácilmente para introducir una cisteína en cualquier posición deseada del polipéptido. La cisteína se utiliza ampliamente para introducir moléculas reactivas, polímeros solubles en agua, proteínas o una amplia gama de otras moléculas, en una proteína de interés. Los métodos adecuados para la incorporación de cisteína en una posición deseada de un polipéptido son conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo los descritos en la patente de EE.UU. N.º 6.608.183, y técnicas de mutagénesis convencionales.

Aminoácidos codificados de modo no natural

35 Una amplia diversidad de aminoácidos codificados de modo no natural son adecuados para introducirse en un polipéptido de relaxina. En general, los aminoácidos codificados de modo no natural introducidos son sustancialmente químicamente inertes para los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, 40 leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina). En algunos casos, los aminoácidos codificados de modo no natural incluyen grupos funcionales de cadenas laterales que reaccionan eficaz y selectivamente con grupos funcionales no encontrados en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero no limitado a, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido de relaxina que incluye un aminoácido codificado de modo no natural que contiene un grupo funcional azido puede 45 hacerse reaccionar con un polímero (incluyendo, pero no limitado a, poli(etilenglicol) o, alternativamente, un segundo polipéptido que contiene una porción alquino para formar un conjugado estable que resulte de la reacción selectiva de los grupos funcionales de azido y alquino para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

50 La estructura genérica de un aminoácido alfa se ilustra como sigue (Fórmula I):

I



55 Un aminoácido codificado de modo no natural es normalmente cualquier estructura que tienen la fórmula anterior en donde el grupo R es cualquier sustituyente distinto del utilizado en los veinte aminoácidos naturales, y puede ser adecuado para el uso en la presente invención. Debido a que los aminoácidos codificados de modo no natural de la invención normalmente difieren de los aminoácidos naturales solamente en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos codificados de modo no natural de amida se unen con otros aminoácidos, incluyendo, pero no limitado a, codificados naturales o no naturales, del mismo modo en el que se forman en los polipéptidos naturales.

60 Sin embargo, los aminoácidos codificados de modo no natural tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquil-, aril-, acil-, ceto-, azido-,

hidroxil-, hidrazina, ciano-, halo-, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno-, sulfonil-, borato, boronato, fosfo-, fosfona, fosfino, heterocíclico, enona, imina, aldehido, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos no naturales de interés que pueden ser adecuados para el uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden un agente de reticulación

5 fotoactivable, aminoácidos con marcadores de spin, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interactúan por enlace covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos fotoliberadores y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales, incluyendo, pero no limitado a, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluyendo, pero no limitado a, mayores de aproximadamente 5 o mayores de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar ligado a carbono, aminoácidos activos para redox, aminoácidos que contienen aminotioácidos, y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

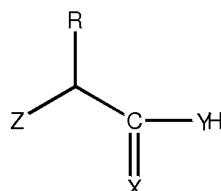
10 Los aminoácidos codificados de modo no natural que pueden ser adecuados para el uso en la presente invención y que son útiles para las reacciones con polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, los que tienen grupos reactivos de carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunos casos, los

20 aminoácidos codificados de modo no natural comprenden una porción sacárida. Algunos ejemplos de los aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Algunos ejemplos de los aminoácidos también incluyen ejemplos en donde el enlace N- u O- natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente no hallado habitualmente en la naturaleza -incluyendo, pero no limitado a, un alqueno, una oxima, 25 un tioéter, una amida y similares. Algunos ejemplos de los aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran habitualmente en proteínas naturales tales como 2-desoxiglucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

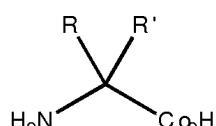
30 Muchos de los aminoácidos codificados de modo no natural proporcionados en el presente documento están disponibles en el mercado, por ejemplo, por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (una división de

35 EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), o Peptech (Burlington, MA, USA). Los que no están disponibles en el mercado se opcionalmente sintetizan como se proporciona en el presente o utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En relación con las técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, Organic Chemistry por Fessenden y Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry por March (Third Edition, 1985, Wiley y Sons, New York); y Advanced Organic Chemistry por Carey y Sundberg (Third Edition, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Véase, también, 40 patentes estadounidenses N.º 7.045.337 y 7.083.970. Además de aminoácidos no naturales que contienen cadenas laterales nuevas, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras de cadena principal modificada, incluyendo, pero no limitado a, como ilustran las estructuras de las Fórmulas II y III:

II



III



45 en donde Z normalmente comprende OH, NH₂, SH, NH-R' o S-R'; X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, normalmente comprenden S u O, y R y R', que opcionalmente son iguales o diferentes, normalmente se seleccionan de la misma lista de componentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la Fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención opcionalmente comprenden sustituciones en el grupo amino o carboxilo como ilustran las fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, pero no se limitan a, α -hidroxiácidos, α -tioácidos, α -aminotiocarboxilatos, 50 incluyendo, pero no limitado a, con cadenas laterales correspondientes a los veinte aminoácidos naturales comunes

- o cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono α opcionalmente incluyen, entre otros, aminoácidos L, D o α - α disustituidos tales como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cílicos, por ejemplo análogos de prolina, así como análogos de prolina de anillo de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, β y γ aminoácidos como β -alanina sustituida y ácido γ -aminobutírico.
- 5 Muchos aminoácidos no naturales se basan en aminoácidos naturales como tirosina, glutamina, fenilalanina y similares, y son adecuados para su uso en la presente divulgación. Los análogos de tirosina incluyen, pero no se limitan a, tirosinas sustituidas en posición para, tirosinas sustituidas en posición orto y tirosinas sustituidas en posición meta, en donde la tirosina sustituida comprende, incluyendo, pero no limitado a, un grupo ceto (incluyendo, pero no limitado a, un grupo acetilo), un grupo benzoilo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo C6 - C20 de cadena lineal o ramificado, un hidrocarburo saturado o insaturado, una grupo O-metilo, un grupo poliéster, un grupo nitro, un grupo alquinilo o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo con múltiples sustituciones. Además, también se contemplan los anillos arilo sustituidos múltiples. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, entre otros, derivados de α -hidroxi, derivados g-sustituidos, derivados cílicos y derivados de glutamina sustituidos con amida. Los análogos de fenilalanina a modo de ejemplo que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, fenilalaninas sustituidas en posición para, fenilalaninas sustituidas en posición orto y fenilalaninas sustituidas en posición meta, en las que el sustituyen comprende, incluyendo, pero no limitado a, un grupo hidroxi, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (incluyendo, pero no limitado a, un grupo acetilo), un benzoilo, un grupo alquinilo o similares. Ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, una p-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc-serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoyl-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-aminoL-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina y una p-propargiloxi-fenilalanina y similares. Ejemplos de estructuras de diversos aminoácidos no naturales que pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención se proporcionan, por ejemplo, en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids." Véase también Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, para análogos de metionina adicionales. La solicitud internacional N.º PCT/US06/47822 titulada "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides" describe la alquilación reductiva de fracciones de amina aromáticas, incluyendo, pero no limitado a, paminofenilalanina y aminación reductiva.
- 10 35 En un caso, se proporcionan las composiciones de un polipéptido de relaxina que incluye un aminoácido no natural (por ejemplo p-(propargiloxi)-fenilalanina). También se proporcionan diversas composiciones que comprenden p-(propargiloxi)-fenilalanina e, incluyen, pero no se limitan a, proteínas o células. En un aspecto, una composición que incluye el aminoácido no natural p-(propargiloxi)-fenilalanina además incluye un ARNt ortogonal. El aminoácido no natural puede estar unido (incluyendo, pero no limitado a, por enlace covalente) al ARNt ortogonal, incluyendo, pero no limitado a, la unión covalente con el ARNt ortogonal a través de un enlace de aminoacilo, la unión covalente con un 3'OH o un 2'OH de un azúcar ribosa terminal del ARNt ortogonal, etc.
- 15 40 45 Las fracciones químicas a través de aminoácidos no naturales que se pueden incorporar en proteínas ofrecen diversas ventajas y manipulaciones de la proteína. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional ceto permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vitro* e *in vivo*. Un aminoácido no natural con átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para el cálculo de las fases de datos de estructura de rayos X. La introducción específica de sitio de átomos pesados usando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la selección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotoreactivos (incluyendo, pero no limitado a, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluyendo, pero no limitado a, fenilazida)), por ejemplo, permiten la fotoreticulación *in vivo* e *in vitro* eficaz de proteínas. Ejemplos de aminoácidos no naturales fotoreactivos incluyen, entre otros, p-azido-fenilalanina y p-benzoyl-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales fotoreactivos después se puede reticular a voluntad por excitación del control temporal que proporciona el grupo fotoreactivo. En 50 55 60 65 un ejemplo, el grupo metilo de un aminoácido no natural se puede sustituir, incluyendo, pero no limitado a, por un grupo metilo marcado con isótopos, como una sonda de estructura local y dinámica, incluyendo, pero no limitado a, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopía de vibración. Por ejemplo, los grupos funcionales alquinilo o azido permiten la modificación selectiva de proteínas con moléculas a través de una reacción de cicloadición [3+2].
- Un aminoácido no natural incorporado en un polipéptido en el extremo amino terminal puede estar compuesto por un grupo R que es cualquier sustituyente distinto del usado en los veinte aminoácidos naturales y un 2º grupo reactivo diferente del grupo NH₂ normalmente presente en los α -aminoácidos (véase la Fórmula I). Se puede incorporar un aminoácido no natural similar en el extremo carboxilo terminal con un 2º grupo reactivo diferente del grupo COOH normalmente presente en los α -aminoácidos (véase la Fórmula I).

Los aminoácidos no naturales de la invención se pueden seleccionar o diseñar para proporcionar características adicionales no disponibles en los veinte aminoácidos naturales. Por ejemplo, el aminoácido no natural opcionalmente se puede diseñar o seleccionar para modificar las propiedades biológicas de una proteína, por ejemplo, en la que se incorporan. Por ejemplo, las siguientes propiedades se pueden modificar opcionalmente por inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, solubilidad, estabilidad, por ejemplo, resistencia térmica, hidrolítica u oxidativa a la degradación enzimática y similares, facilidad de purificación y procesamiento, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, actividad catalítica, potencial redox, vida media, capacidad para reaccionar con otras moléculas, por ejemplo, de forma covalente o de forma no covalente y similares.

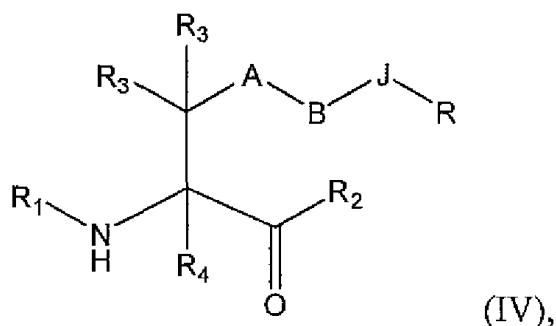
10 ESTRUCTURA Y SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES: GRUPOS CARBONILO, SIMILARES A CARBONILO, CARBONILO ENMASCARADO, CARBONILO PROTEGIDO Y GRUPOS HIDROXILAMINA

15 En algunas realizaciones la presente invención proporciona una relaxina enlazada a un polímero soluble en agua, por ejemplo, un PEG, mediante un enlace oxima.

20 Muchos tipos de aminoácidos codificados de modo no natural son adecuados para la formación de enlaces oxima. Estos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos codificados de modo no natural que contienen un grupo carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Los aminoácidos se describen en las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2006/0194256, 2006/0217532, y 2006/0217289 y WO 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides". Algunos aminoácidos codificados de modo no natural también se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.083.970 y patente de EE.UU. N.º 7.045.337.

25 La invención utiliza polipéptidos de relaxina que están sustituidos en una o más posiciones con un aminoácido para-acetil fenilalanina. La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen in Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), incorporado por referencia. Un experto en la materia puede preparar de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo. Además, las síntesis a modo de ejemplo no limitantes de un aminoácido no natural que se incluyen en el presente documento se presentan en las figuras 4, 24-34 y 36-39 de la patente de EE.UU. N.º 7.083.970, que se incorpora al presente por referencia en su totalidad.

30 Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten diversas reacciones para unir las moléculas a través de reacciones de adición nucleófila, entre otras. Tales grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo), un grupo similar a carbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo), un grupo carbonilo enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo)), o un grupo carbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluyendo un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) tras la desprotección). Los aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de la Fórmula (IV):

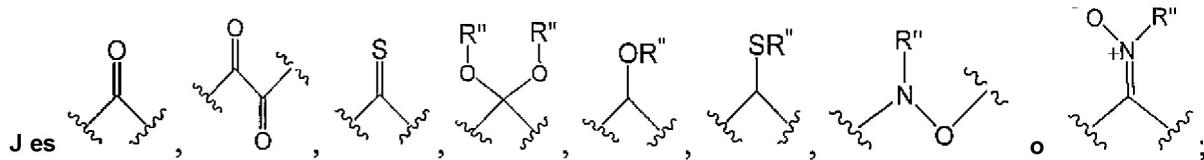


40 en donde:

45 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

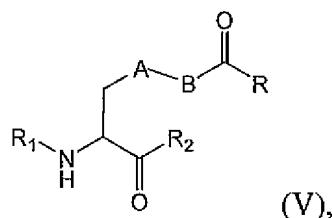
50 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)_k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -

$N(R')C(S)N(R')$ -, $-N(R')S(O)_kN(R')$ -, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')$ -, $-C(R')=N-N=$, $-C(R')_2N=N-$, y $-C(R')_2N(R')-N(R')$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;



- 5 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
cada R'' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando hay más de un grupo R'' presente, dos R'' opcionalmente forman un heterocicloalquilo;
10 R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
 R_2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
15 cada uno de R_3 y R_4 es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o los grupos R_3 y R_4 o dos R_3 opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;
o los grupos -A-B-J-R juntos forman un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado;
20 o el grupo -J-R junto forma un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado;
con la condición de que cuando A sea fenileno y cada R_3 sea H, B esté presente; y de que cuando A sea $-(CH_2)_4$ y cada R_3 sea H, B no sea $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y de que cuando A y B estén ausentes cada R_3 sea H, R no sea metilo.

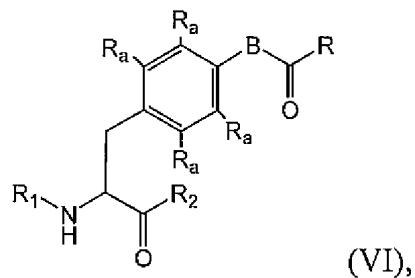
- 25 Además, teniendo la estructura de Fórmula (V) se incluyen:



en donde:

- 30 A es opcional, y cuando está presente es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquenileno inferior, heteroalquenileno sustituido, heterocicloalquenileno inferior, heterocicloalquenileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;
35 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquenileno inferior, heteroalquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alqueno o alqueno sustituido)-, -S-, -S-(alqueno o alqueno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alqueno o alqueno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alqueno o alqueno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alqueno o alqueno sustituido)-, -N(R')-, -NR'- (alqueno o alqueno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alqueno o alqueno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alqueno o alqueno sustituido)-, -N(R')CO-(alqueno o alqueno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂N=N-, y -C(R')₂N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
40 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
45 R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
50 R_2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
con la condición de que cuando A sea fenileno, B esté presente; y de que cuando A sea $-(CH_2)_4$; B no sea $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y de que cuando A y B estén ausentes, R no sea metilo.

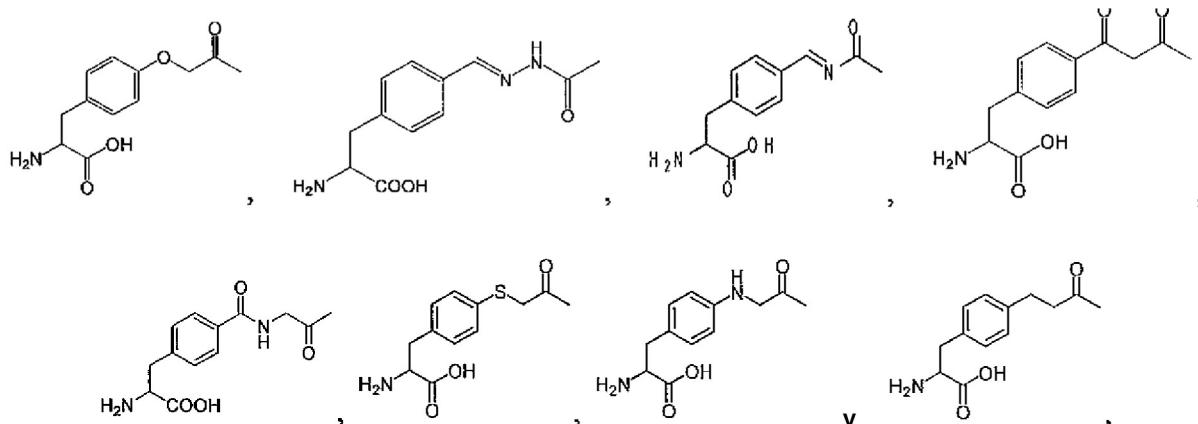
Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (VI):



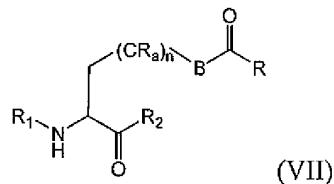
en donde:

- 5 B es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
- 10 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 15 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
- R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
- 20 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR' en donde cada R' se independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



- 25 en donde tales compuestos son opcionalmente un grupo protegido amino, carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.
- 30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



- 35 en donde

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

5 alquieno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquieno inferior, heteroalquieno inferior sustituido, -O-, -O-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S-, -S-(alquieno o alquieno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquieno o alquieno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')CO-(alquieno o alquieno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

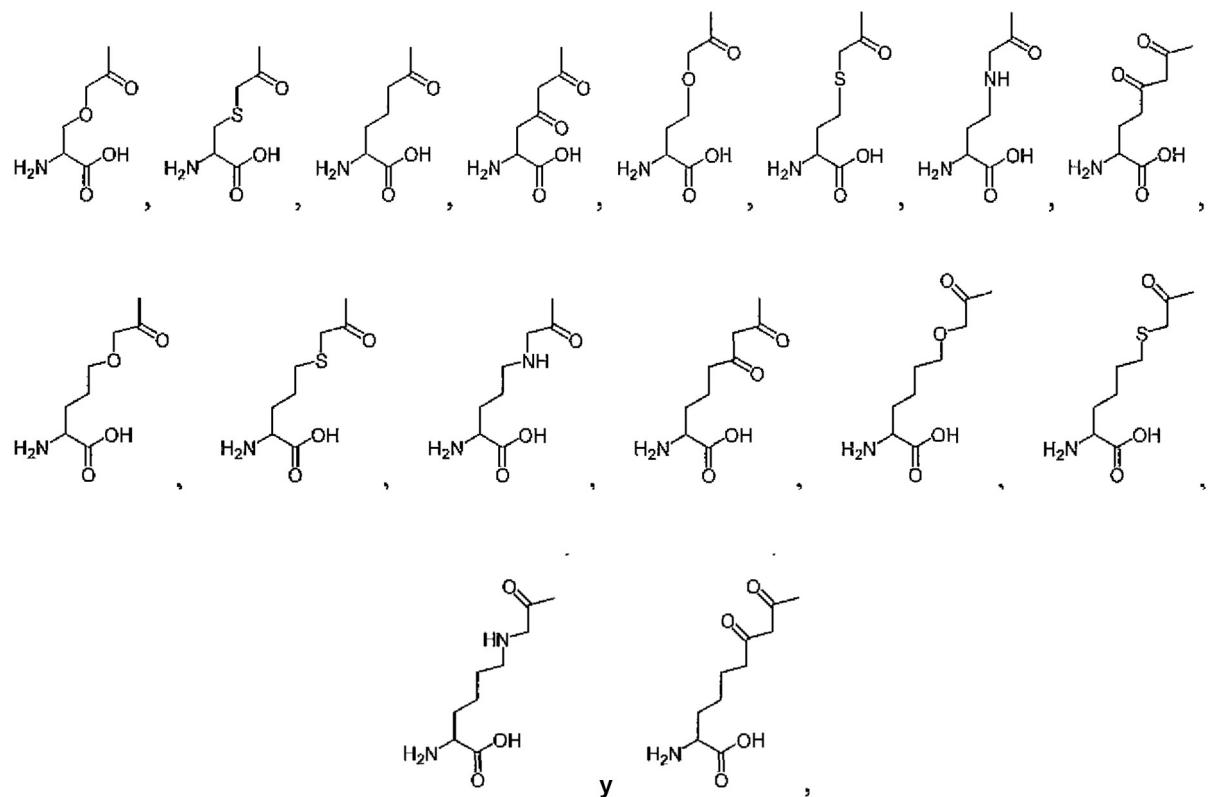
10 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

10 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

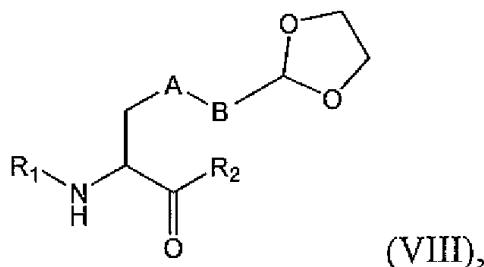
con la condición de que cuando A sea -(CH₂)₄-, B no sea -NHC(O)(CH₂CH₂)-.

20 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



25 en donde los compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.

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



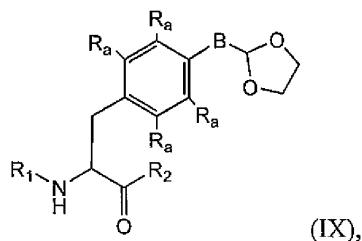
en donde A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

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



B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

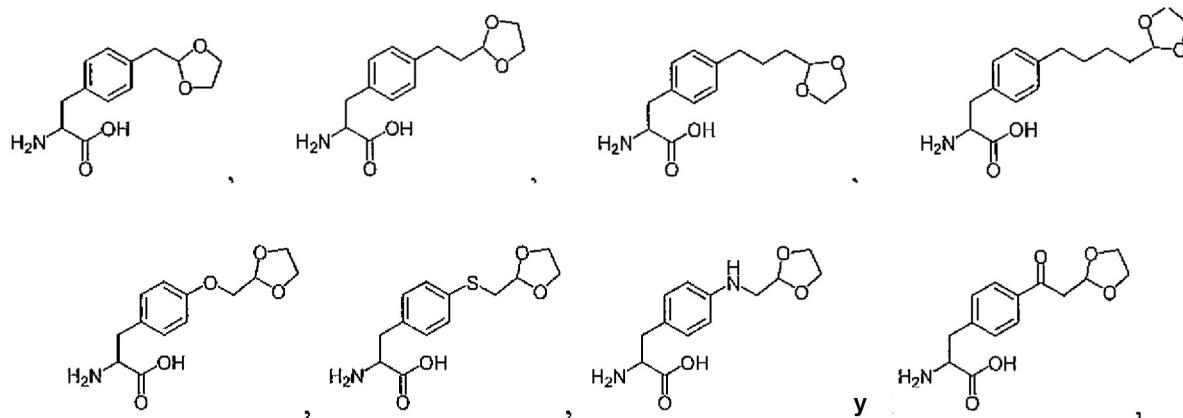
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

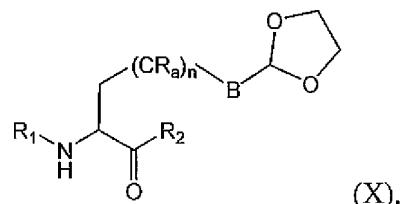
en donde cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR' en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



en donde tales compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.

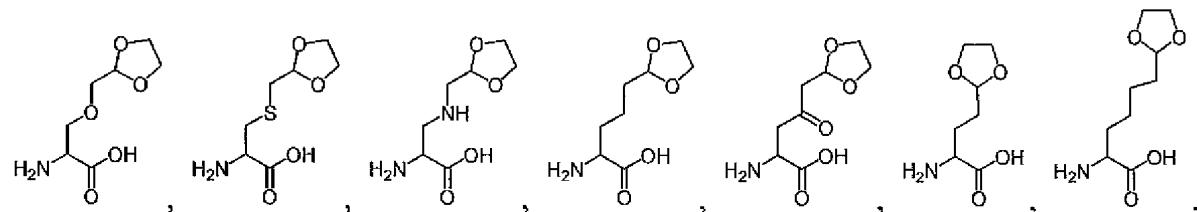
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (X):



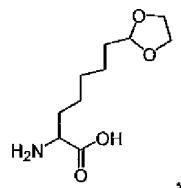
10

en donde B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')2-N=N-, y -C(R')2-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquíleno sustituido; R es H, alquilo, alquíleno sustituido, cicloalquilo o cicloalquíleno sustituido; R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquíleno sustituido, -N(R')2, -C(O)kR' en donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')2, -OR', y -S(O)kR', en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquíleno sustituido; y n es de 0 a 8.

30 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



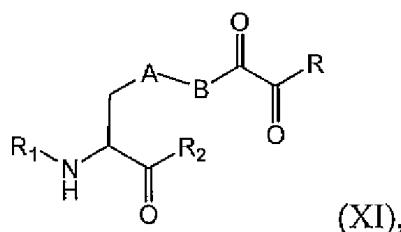
35 y



en donde tales compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.

Además de estructuras monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden incluir grupos como dicarbonilo, similares a dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos dicarbonilo protegido.

Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (XI):



en donde A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

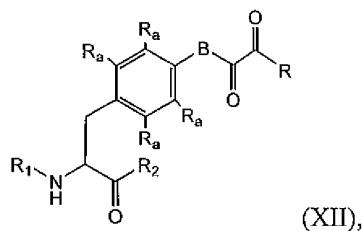
B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-,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

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

R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

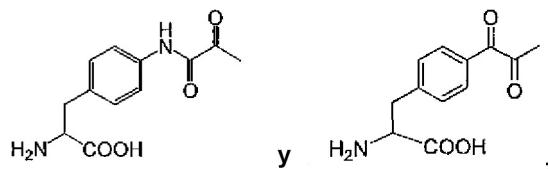
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (XII):



B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')2-N=N-, y -C(R')2N(R')N(R')-

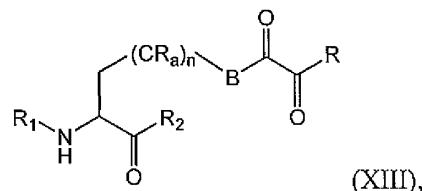
N(R')-N(R'), en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; en donde cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR' en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

10 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



15 en donde los compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.

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

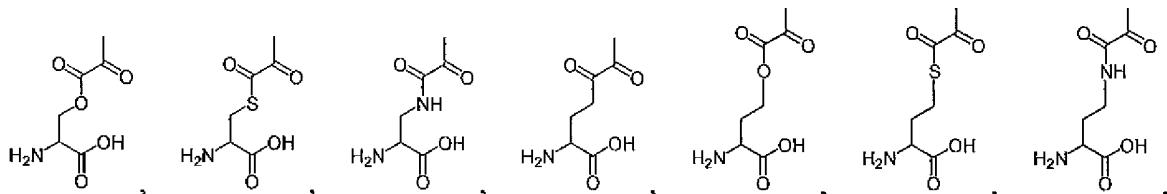


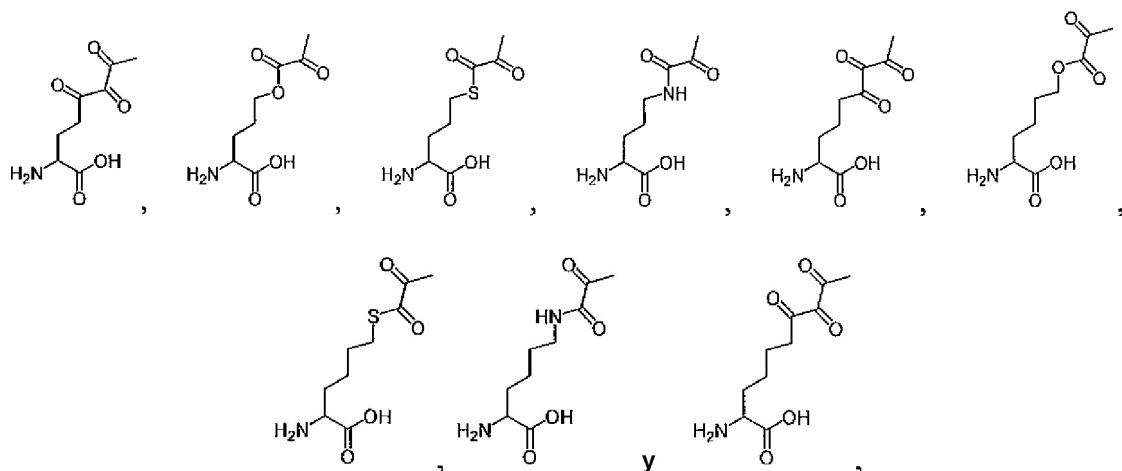
25 en donde B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno inferior sustituido, -O-, -O-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S-, -S-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -S(O)_k- en donde k es 1, 2, o 3, -S(O)_k(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')CO-(alquíleno o alquíleno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

30 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

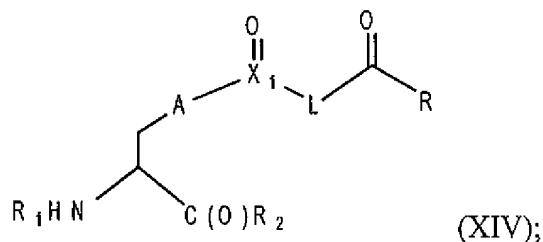
35 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' en donde k es 1, 2, o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es de 0 a 8.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:





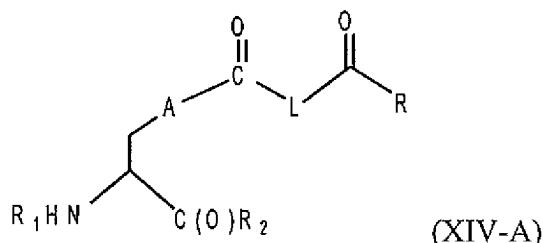
- 5 en donde tales compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente carboxilo protegido, opcionalmente amino protegido y carboxilo protegido o una sal de los mismos. Además, estos aminoácidos no naturales y cualquiera de los siguientes aminoácidos no naturales se puede incorporar en un polipéptido de aminoácidos no naturales.
- 10 Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XIV):



en donde:

- 15 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;
- 20 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 25 R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
- R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
- X1 es C, S o S(O); y L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R')(alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

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



en donde:

- 35 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno

inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

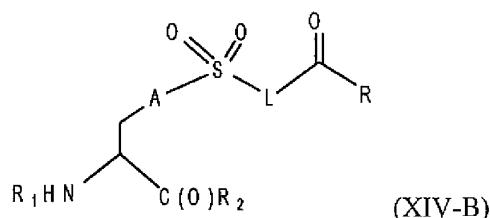
5 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

10 R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

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



15 en donde:

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

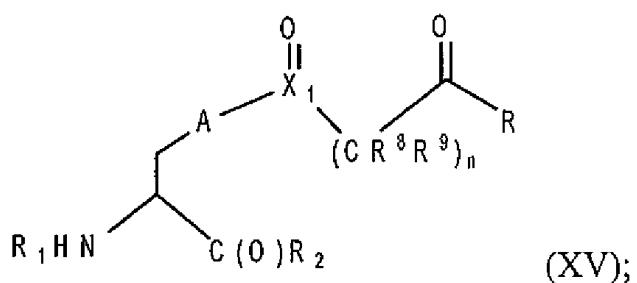
20 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

25 R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

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



35 en donde:

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

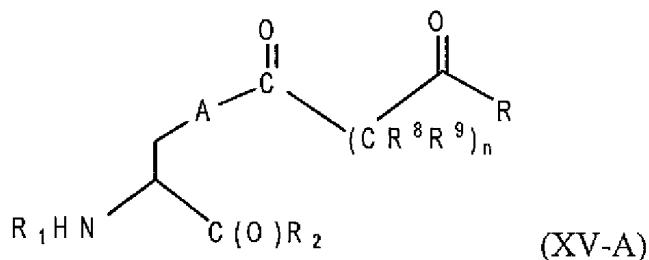
40 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

45 R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

X1 es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R8 y R9 en cada grupo CR8R9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R8 y R9 pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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

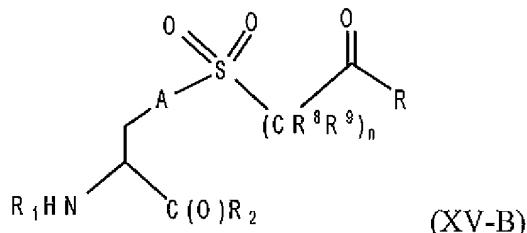


5

en donde:

- 10 A es opcional, y cuando está presente es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquenileno inferior, heteroalqueno sustituido, heterocicloalqueno inferior, heterocicloalqueno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquenilo o aralquenilo sustituido;
- 15 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 15 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
- 20 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
- n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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

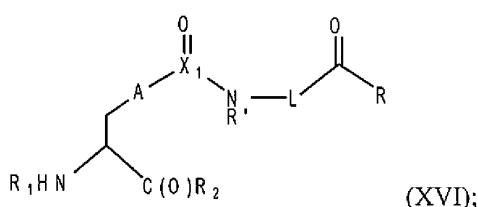


25

en donde:

- 30 A es opcional, y cuando está presente es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquenileno inferior, heteroalqueno sustituido, heterocicloalqueno inferior, heterocicloalqueno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquenilo o aralquenilo sustituido;
- 35 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 35 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y
- 40 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;
- n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R⁸ y R⁹ en cada grupo CR⁸R⁹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R⁸ y R⁹ pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R⁸ adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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



en donde:

5 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

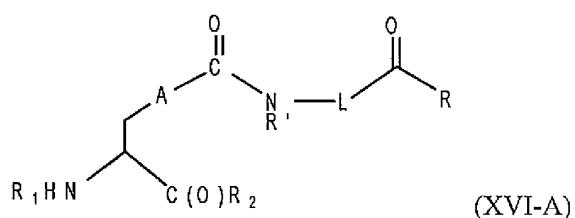
10 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

10 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

15 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

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



en donde:

20 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

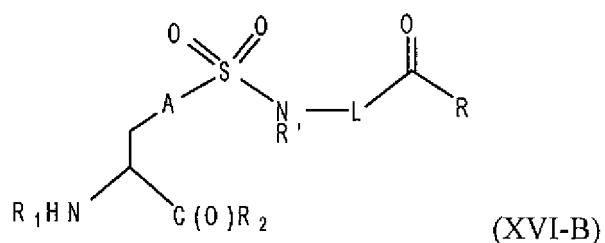
25 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

30 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

30 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

35 L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R') (alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

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



40 en donde:

40 A es opcional, y cuando está presente es alquíleno inferior, alquíleno inferior sustituido, cicloalquíleno inferior, cicloalquíleno inferior sustituido, alqueníleno inferior, alqueníleno inferior sustituido, alquiníleno, heteroalquíleno inferior, heteroalquíleno sustituido, heterocicloalquíleno inferior, heterocicloalquíleno inferior sustituido, aríleno, aríleno sustituido, heteroaríleno, heteroaríleno sustituido, alcaríleno, alcaríleno sustituido, aralquíleno o aralquíleno sustituido;

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

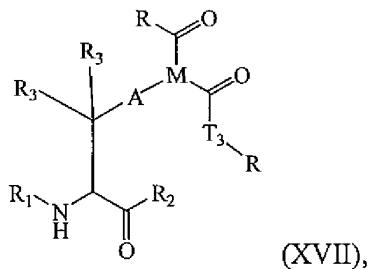
50 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

50 R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

50 L es alquíleno, alquíleno sustituido, N(R') (alquíleno) o N(R')(alquíleno sustituido), en donde R' es H, alquilo,

alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

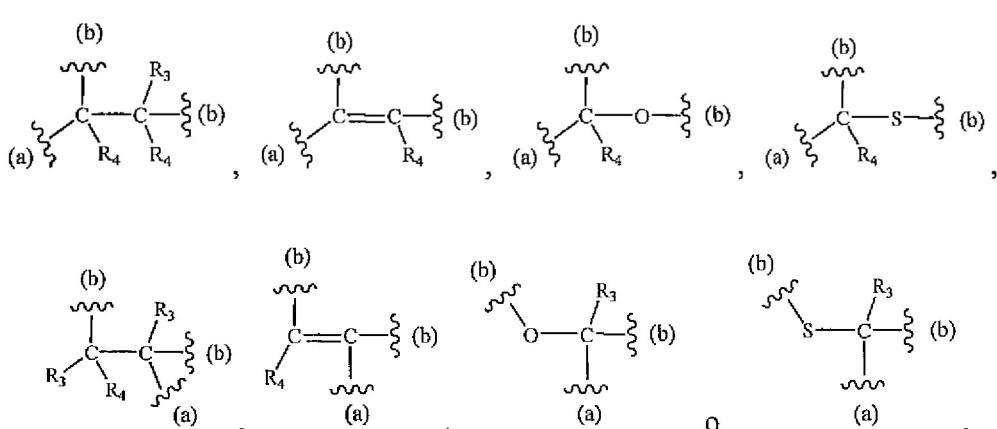
Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XVII):



en donde:

10 A es opcional, y cuando está presente es alqueno inferior, alqueno inferior sustituido, cicloalqueno inferior, cicloalqueno inferior sustituido, alquenilo inferior, alquenilo inferior sustituido, alquinilo, heteroalqueno inferior, heteroalqueno inferior sustituido, heterocicloalqueno inferior, heterocicloalqueno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralqueno o aralqueno sustituido;

15 M es $-\text{C}(\text{R}_3)-$,



en donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R_3 y R_4 o dos grupos R_3 o dos grupos R_4 opcionalmente de un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

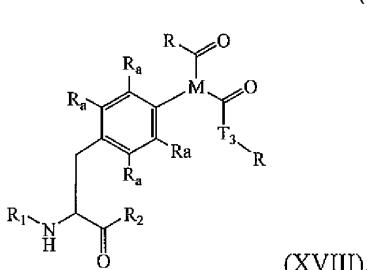
20 R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

T_3 es un enlace, $\text{C}(\text{R})(\text{R})$, O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

25 R₁ es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

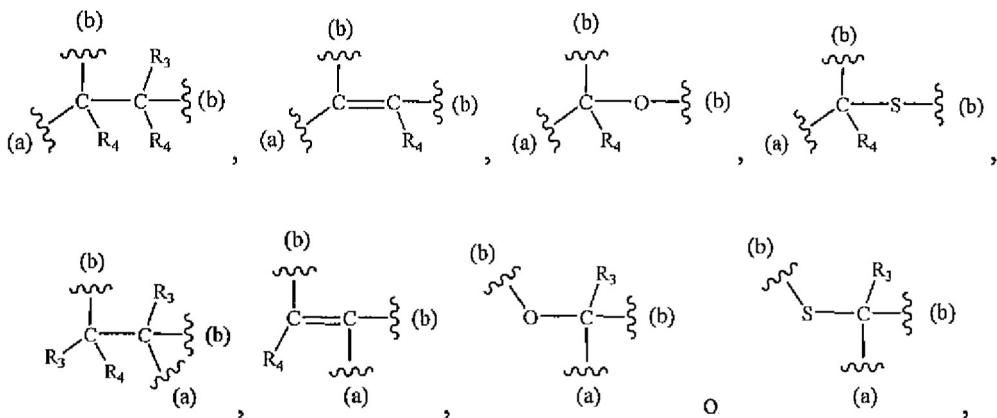
R₂ es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

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



en donde:

35 M es $-\text{C}(\text{R}_3)-$,



en donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R_3 y R_4 o dos grupos R_3 o dos grupos R_4 opcionalmente de un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

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

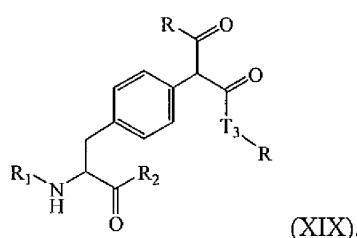
10 T_3 es un enlace, $C(R)(R)$, O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

15 R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R_2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

20 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en donde k es 1, 2, o 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, y $-S(O)_kR'$ en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

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



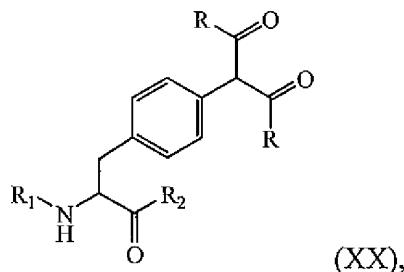
(XIX),

en donde:

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

T_3 es O o S.

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

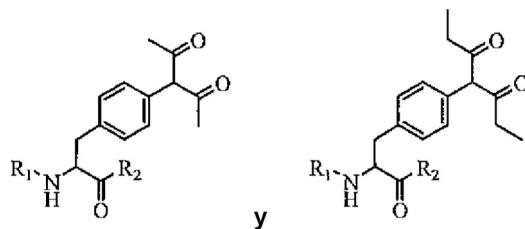


(XX),

30 en donde:

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

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



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

En la presente divulgación, un aminoácido no natural que tiene grupos hidroxilo y amino adyacentes se puede incorporar en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, 5-hidroxilisina tienen un grupo hidroxilo adyacente a la epsilon amina. Las condiciones de reacción para generar el aldehído normalmente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones moderadas para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es normalmente aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar aproximadamente 1,5 de metaperyodato sódico a una solución tamponada del polipéptido seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo la patente de EE.UU. N.º 6.423.685.

La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo se pueden hacer reaccionar selectivamente con un reactivo que contienen hidroxilamina en condiciones moderadas en solución acuosa para formar el enlace oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Por otra parte, Además, la única reactividad del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las demás cadenas laterales de los aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125-1128 (1997).

30 **Estructura y síntesis de los aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina**

Se hace referencia a la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/316,534 (publicación de EE.UU. N.º 20060189529). Por lo tanto, las divulgaciones proporcionadas en Sección V (titulada "Aminoácidos no naturales"), Parte B (titulada "Estructura y síntesis de los aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina"), en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/316.534 (publicación de EE.UU. N.º 20060189529) se aplica por completo a los métodos, composiciones (incluyendo las fórmulas I-XXXV), técnicas y estrategias para fabricar, purificar, caracterizar y utilizar los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en el presente documento. Las publicaciones de patentes de EE.UU. N.º 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y el documento WO 2006/069246 titulado "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", también se hacen referencia.

SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

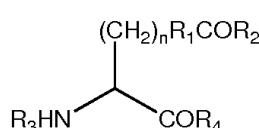
Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente divulgación están disponibles en el mercado, por ejemplo, por Sigma (EE.UU.) o Aldrich (Milwaukee, WI, EE.UU.). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente documento o como se proporciona en varias publicaciones o utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En relación con las técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, *Organic Chemistry* por Fessenden y Fessenden, (1982, Segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* por March (Tercera edición, 1985, Wiley y Sons, New York); y *Advanced Organic Chemistry* por Carey y Sundberg (Tercera Edición, Partes A y B, 1990, Plenum Press, New York). Publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos no naturales incluyen, por ejemplo, el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas y col., (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. *J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J.C. y col. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4-[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]aminoquinoline (Chloroquine). *J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues.

J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)- Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton y col., (1987) Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L- alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; y, Subasinghe y col., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. Véase también la publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0198637 titulada "Protein Arrays".

10 **A. Grupos carbonilo reactivos**

Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten diversas reacciones para enlazar moléculas (incluyendo, pero no limitado a, PEG u otras moléculas solubles en agua) a través de una adición nucleófila o reacciones de condensación con aldol, entre otras.

15 Aminoácidos que contienen carbonilo a modo de ejemplo se pueden representar de la siguiente forma:



20 en donde n es 0-10; R₁ es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido; R₂ es H, un alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido; y R₃ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R₄ es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal. En algunos casos, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y la porción cetona se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo. En algunos casos, n es 1, R₁ es fenilo y R₂ es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y la porción cetona se ubica en la posición meta respecto a la cadena lateral alquilo.

25 La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen in Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Un experto en la materia puede preparar de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo.

30 En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido codificado de modo no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional carbonilo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad de aldehído útil para la conjugación de reacciones de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. 35 Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede utilizar una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o se puede exponer mediante digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa moderadas usando peryodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, y col., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner y col., J. Biol Chem, 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica 40 se limitan al aminoácido en el extremo amino terminal del péptido o la proteína.

45 En la presente divulgación, un aminoácido codificado de modo no natural que tiene grupos hidroxilo y amino adyacentes se puede incorporar en el polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, 5-hidroxilisina tienen un grupo hidroxilo adyacente a la épsilon amina. Las condiciones de reacción para generar el aldehído normalmente implican la adición de un exceso molar de metaperyodato sódico en condiciones moderadas para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es normalmente aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar aproximadamente 1,5 de metaperyodato sódico a una solución tamponada del polipéptido seguido de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo patente de EE.UU. N.º 6.423.685.

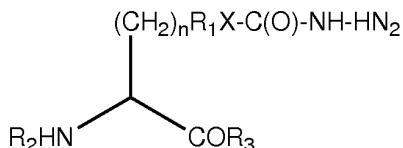
50 La funcionalidad carbonilo puede reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones moderadas en una solución acuosa para formar los enlaces de hidrazona, oxima o semicarbazona correspondientes, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc, 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 55: 117:3893-3899 (1995). Por otra parte, Además, la única reactividad del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las demás cadenas laterales de los aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., y col., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., Science 276:1125-1128 (1997).

60 **B. Grupos reactivos de hidrazina, hidrazida o semicarbazida**

Los aminoácidos codificados de modo no natural que contienen un que contienen un grupo nucleófilo, tales como

una hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con diversos grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero no limitado a, con PEG u otros polímeros solubles en agua).

5 Aminoácidos a modo de ejemplo que contienen hidrazina, hidrazida o semicarbazida se pueden representar de la siguiente forma:



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

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

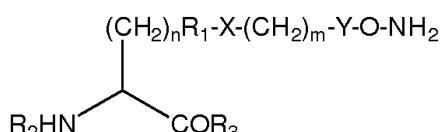
20 Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida están disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, L-glutamato- α -hidrazida se encuentra disponible por Sigma Chemical (St. Louis, MO). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos que no estén disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N. 6.281.211.

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

30 C. Aminoácidos que contienen aminooxi

35 Los aminoácidos codificados de modo no natural que contienen un grupo aminooxi (también denominado hidroxilamina) permiten la reacción con diversos grupos electrófilos para formar conjugados (incluyendo, pero no limitado a, con PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidrazinas, hidrazidas y las semicarbazidas, la nucleofильidad mejorada del grupo aminooxi le permite reaccionar de forma eficaz y selectiva con diversas moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con una reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001). Aunque que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, no obstante, una oxima resulta generalmente de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene 40 carbonilo, por ejemplo una cetona.

Aminoácidos a modo de ejemplo que contienen grupos aminooxi se pueden representar de la siguiente forma:



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

55 Los aminoácidos que contienen aminooxi se pueden preparar a partir de precursores aminoacídicos fácilmente disponibles (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco y R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003). Determinados aminoácidos que contienen aminooxi, tales como ácido L-2-amino-4-(aminooxi)butírico, se han aislado a partir de fuentes naturales (Rosenthal, G., Life Sci, 60: 1635-1641 (1997). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos que contienen aminooxi.

D. Grupos reactivos azida y alquino

La única reactividad de los grupos funcionales azida y alquino los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, particularmente azidas alifáticas, y alquinos generalmente son estables a condiciones químicas reactivas comunes. En particular, tanto la azida como

5 los grupos funcionales alquino son inertes a las cadenas laterales (es decir, los grupos R) de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en los polipéptidos naturales. Cuando se aproximan, sin embargo, la naturaleza "propensa a reaccionar" de los grupos azida y alquino se revelan y reaccionan selectiva y eficazmente a través de una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin J., y col., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

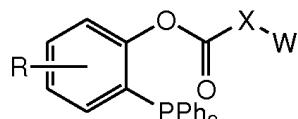
Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, por ejemplo, Padwa, A., en *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. en *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176) en lugar de una

15 sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos codificados de modo no natural que tienen cadenas laterales que contienen azida y alquilo permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido codifica no natural. La reacción de cicloadición que implica un polipéptido de relaxina que contienen azida o alquino se puede realizar a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II) (incluyendo, pero no limitado a, en forma de una cantidad catalítica de CuSO₄) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en una cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., y col., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., y col., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, y col., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Agentes reductores a modo de ejemplo incluyen, entre otros, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe²⁺, Co²⁺, y un potencial eléctrico aplicado.

20 En algunos casos, cuando se desea una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] entre una azida y un alquino, el polipéptido de relaxina comprende un aminoácido codificado de modo no natural que comprende una porción alquino y el polímero soluble en agua que se une al aminoácido comprende una porción azida. Alternativamente, la reacción inversa (es decir, con la porción azida en el aminoácido y la porción alquino presente en el polímero soluble en agua) también se puede realizar.

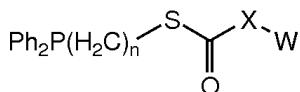
25 30 El grupo funcional azida también se puede reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un éster arílico y puede funcionalizarse apropiadamente con una porción aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante después reacciona de forma eficaz con un enlace éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser un alquilazida (incluyendo, pero no limitado a, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o un arilazida (p-azido-fenilalanina).

35 Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo que contienen un éster arílico y una porción fosfina a modo de ejemplo se pueden representar de la siguiente forma:



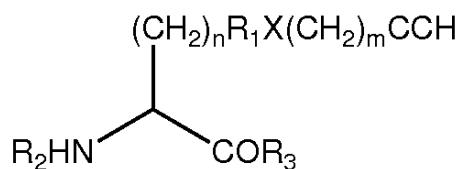
45 en donde X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, grupos alquilo sustituido y arilo sustituido. Grupos R a modo de ejemplo incluyen, entre otros, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. R', R'', R''' y R'''' cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido, incluyendo, pero no limitado a, arilo sustituido con halógenos 1-3, alquilo sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son 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 no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del análisis de sustituyentes anterior, el experto en la materia entenderá que el término "alquilo" implica incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquilo (incluyendo, pero no limitado a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (incluyendo, pero no limitado a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ y similares).

50 55 El grupo funcional azida también se puede reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster y puede funcionalizarse apropiadamente con una porción aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida *in situ* y la amina resultante después reacciona de forma eficaz con el enlace tioéster para generar la amida correspondiente. Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo que contienen un tioéster y una porción fosfina a modo de ejemplo se pueden representar de la siguiente forma:



en donde n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo y W es un polímero soluble en agua.

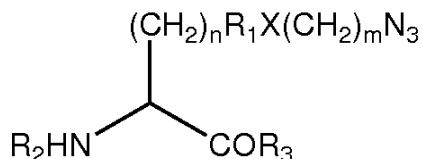
- 5 Aminoácidos a modo de ejemplo que contienen alquino a modo de ejemplo se pueden representar de la siguiente forma:



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

15 Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la proparilglicina está disponible en el mercado en Peptech (Burlington, MA). Alternativamente, los aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, p-propargiloxifenilalanina se puede sintetizar, por ejemplo, como se describe en Deiters, A., y col., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), y 4-alquinil-L-fenilalanina se puede sintetizar como se describe en Kayser, B., y col., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Un experto en la materia puede preparar otros aminoácidos que contienen alquino.

- 20 25 Aminoácidos a modo de ejemplo que contienen azida a modo de ejemplo se pueden representar de la siguiente forma:



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

35 40 Los aminoácidos que contienen azida están disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, 4-azidofenilalanina se puede obtener de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Para los aminoácidos que contienen azida que no están disponibles en el mercado, el grupo azida se puede preparar relativamente fácil utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitado a, mediante desplazamiento de un grupo saliente adecuado (incluyendo, pero no limitado a, haluro, mesilato, tosilato) o a través de la apertura de una lactona protegida adecuadamente. Véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry de March (Tercera edición, 1985, Wiley y Sons, New York).

45 **E. Grupos reactivos aminotiol**

- 50 La única reactividad de los grupos funcionales aminotio beta-sustituidos los hace extremadamente útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehido a través de la formación de la tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao y J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas realizaciones, los aminoácidos aminotiol beta-sustituidos se pueden incorporar en los polipéptidos de relaxina y después reaccionan con polímeros solubles en agua que comprenden una funcionalidad aldehido. En algunas realizaciones, un polímero soluble en agua, un conjugado de fármacos u otra carga se puede acoplar a un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido aminotiol beta-sustituido a través de la formación de la

tiazolidina.

F. Grupos reactivos adicionales

- 5 Grupos reactivos adicionales y aminoácidos codificados de modo no natural, incluyendo, pero no limitado a, para-
amino-fenilalanina, que se pueden incorporar en los polipéptidos de relaxina de la invención se describen en las
siguientes solicitudes de patentes: publicación de patente de EE.UU. N.º 2006/0194256, publicación de patente de
EE.UU. N.º 2006/0217532, publicación de patente de EE.UU. N.º 2006/0217289, patente provisional de EE.UU. N.º
10 60/755.338; patente provisional de EE.UU. N.º 60/755.711; patente provisional de EE.UU. N.º 60/755.018; solicitud
de patente internacional N.º PCT/US06/49397; WO 2006/069246; patente provisional de EE.UU. N.º 60/743.041;
patente provisional de EE.UU. N.º 60/743.040; solicitud de patente internacional N.º PCT/US06/47822; patente
provisional de EE.UU. N.º 60/882.819; patente provisional de EE.UU. N.º 60/882.500; y patente provisional N.º
15 60/870.594. Estas solicitudes también establecen grupos reactivos que pueden estar presentes en PEG u otros
polímeros, incluyendo, pero no limitado a, grupos hidroxilamina (aminooxi) para la conjugación.

15 CAPTACIÓN CELULAR DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Típicamente, captación de aminoácidos no naturales por una célula es algo que se considera cuando se diseñan y
20 seleccionan aminoácidos no naturales, incluyendo, pero no limitado a, para la incorporación en una proteína. Por
ejemplo, la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que estos compuestos probablemente no sean
permeables para las células. Los aminoácidos naturales se captan en la célula eucariota mediante una recolección
25 de sistemas de transporte a base de proteínas. Puede realizarse una exploración rápida que evalúa qué
aminoácidos no naturales, si los hubiera, captan las células. Véase, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por
ejemplo, publicación de patente de EE.UU. N.º US 2004/0198637 titulada "Protein Arrays"; y Liu, D.R. & Schultz,
P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS Estados Unidos
96:4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con diversos ensayos, una alternativa para el diseño de
aminoácidos no naturales que sean susceptibles de rutas de captación celular es proporcionar rutas biosintéticas
para crear aminoácidos *in vivo*.

30 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Ya existen muchas rutas biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque
35 es posible que en la naturaleza no exista un método biosintético para un aminoácido no natural particular,
incluyendo, pero no limitado a, en una célula, tales métodos se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, en
una célula hospedadora opcionalmente se generan rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales añadiendo
nuevas enzimas o modificando rutas de células hospedadoras existentes. Las nuevas enzimas adicionales son
40 opcionalmente enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en WO 2002/085923 titulado "*In vivo* incorporation of
unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los
genes para estas enzimas se pueden introducir en una célula eucariota mediante la transformación de la célula con
45 un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta
enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente,
se proporcionan en los ejemplos a continuación. Se encuentran secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en
Genbank. También se añaden opcionalmente enzimas desarrolladas artificialmente a una célula de la misma
50 manera. De este modo, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos
no naturales.

Hay disponibles diversos métodos para producir nuevas enzimas para su uso en rutas biosintéticas o para evolución
55 de rutas existentes. Por ejemplo, se utiliza opcionalmente la recombinación recursiva, incluyendo, pero no limitado a,
como se desarrolla por Maxygen, Inc. (disponible en línea en maxygen.com), para desarrollar nuevas enzimas y
rutas. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, Nature 370(4):389-
391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for
molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 91:10747-10751. De forma similar, DesignPath™, desarrollado por
55 Genencor (disponible en línea en genencor.com) se utiliza opcionalmente para ingeniería genética de rutas
metabólicas, incluyendo, pero no limitado a, para modificar por ingeniería genética una ruta para crear O-metil-
L-tirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye rutas existentes en organismos huésped utilizando una
combinación de nuevos genes incluyendo, pero no limitado a, los identificados a través de genómica funcional, y
60 evolución y diseño molecular. Diversa Corporation (disponible en línea en diversa.com) también proporciona
tecnología para explorar rápidamente bibliotecas de genes y rutas de genes incluyendo, pero no limitado a, para
crear nuevas rutas.

Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética modificada por ingeniería genética de la
65 invención se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, incluyendo, pero no
limitado a, una cantidad celular natural, pero no hasta un grado tal que afecte a la concentración de los otros
aminoácidos o agote los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de este modo son de
aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que la célula se transforma con un plásmido que

comprende los genes utilizados para producir enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, se utilizan las selecciones *in vivo* opcionalmente para optimizar adicionalmente la producción del aminoácido no natural tanto para síntesis de proteínas ribosomales como para crecimiento celular.

5 POLIPÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS NO NATURALES

La incorporación de un aminoácido no natural puede realizarse para diversos fines, incluyendo, pero no limitado a, adaptar cambios en la estructura o función de una proteína, cambiar el tamaño, acidez, nucleofilidad, enlaces de hidrógeno, hidrofobicidad, accesibilidad de los sitios diana de proteasa, dirección a una porción (incluyendo, pero no limitado a, para una matriz proteica), añadir una molécula biológicamente activa, unir un polímero, unir un radionúclido, modular la vida media en suero, modular la penetración tisular (por ejemplo, tumores), modular el transporte activo, modular la especificidad o distribución en un tejido, célula u órgano, modular la inmunogenicidad, modular la resistencia a proteasa, etc. Las proteínas que incluyen un aminoácido no natural pueden tener propiedades biofísicas o catalíticas mejoradas o incluso completamente nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente por inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas o fotoquímicas, capacidad catalítica, vida media (incluyendo, pero no limitado a, vida media en suero), capacidad para reaccionar con otras moléculas incluyendo, pero no limitado a, de forma covalente o no covalente y similares. Las composiciones que incluyen las proteínas que incluyen al menos un aminoácido no natural, son útiles para, incluyendo, pero no limitado a, nuevos agentes terapéuticos, diagnóstico, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos) e incluyendo, pero no limitado a, el estudio de la estructura y la función de la proteína. Véase, por ejemplo, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

10

15

20

25

30

35

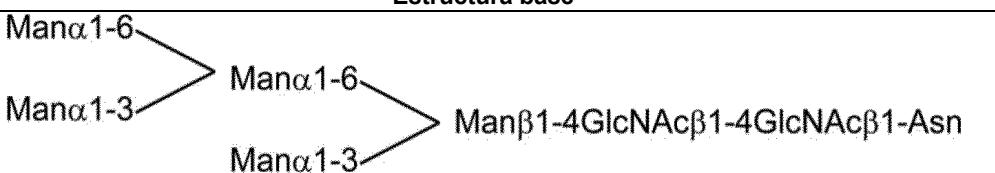
40

35 En un aspecto de la invención, una composición incluye al menos una proteína con al menos uno, incluyendo, pero no limitado a, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez o más aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales pueden ser los mismos o diferentes, incluyendo, pero no limitado a, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. En otro aspecto, una composición incluye una proteína con al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en la proteína se sustituye por el aminoácido no natural. Para una proteína determinada con más de un aminoácido no natural, los aminoácidos no naturales pueden ser idénticos o diferentes (incluyendo, pero no limitado a, la proteína puede incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales o puede incluir dos del mismo aminoácido no natural). Para una proteína determinada con más de dos aminoácidos no naturales, los aminoácidos no naturales pueden ser idénticos, diferentes o una combinación de múltiples aminoácidos no naturales del mismo tipo con al menos un aminoácido no natural diferente.

Una característica de la invención son las proteínas o polipéptidos de interés con al menos un aminoácido no natural. La invención también incluye polipéptidos o proteínas con al menos un aminoácido no natural producido usando las composiciones y los métodos de la invención. También puede estar presente con la proteína un excipiente (incluyendo, pero no limitado a, un excipiente farmacéuticamente aceptable).

Al producir las proteínas o polipéptidos de interés con al menos un aminoácido no natural en células eucariotas, las proteínas o polipéptidos normalmente incluirán modificaciones postraduccionales eucariotas. En ciertos casos, una proteína incluye al menos un aminoácido no natural y al menos una modificación postraduccional que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, en donde la modificación postraduccional no es realizada por una célula procariota. Por ejemplo, la modificación postraduccional incluye, entre otros, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de enlaces de glucolípidos, glucosilación y similares. En un aspecto, la modificación postraduccional incluye unión de un oligosacárido (incluyendo, pero no limitado a, (GlcNAc-Man)2-Man-GlcNAc-GlcNAc) con una asparagina por un enlace de GlcNAc-asparagina. Véase la tabla 1 que enumera algunos ejemplos de oligosacáridos ligados a N de proteínas eucariotas (también pueden estar presentes fracciones adicionales, que no se muestran). En otro aspecto, la modificación postraduccional incluye la unión de un oligosacárido (incluyendo, pero no limitado a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por un enlace GalNAc-serina o un enlace GalNAc-treonina o un enlace GlcNAc-serina o un enlace GlcNAc-treonina.

55 **Tabla 1: Ejemplos de oligosacáridos a través de enlace GLCNAC+**

Tipo	Estructura base
ALTA MANOSA	

HÍBRIDO	Man α 1-6 GlcNAc β 1-2 — Man α 1-3	Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn
COMPLEJO	GlcNAc β 1-2 — Man α 1-6 GlcNAc β 1-2 — Man α 1-3	Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn
XILOSA	Man α 1-6 Xyl β 1-2	Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn

5 En otro aspecto más, la modificación postraduccional incluye procesamiento proteolítico de precursores (incluyendo, pero no limitado a, precursor de calcitonina, precursor de péptido relacionado con gen de calcitonina, hormona preproparatiroidea, preproinsulina, proinsulina, prepropiomelanocortina, proopiomelanocortina y similares), ensamblaje en una proteína de múltiples subunidades o ensamblaje macromolecular, traslación a otro sitio en la célula (incluyendo, pero no limitado a, orgánulos, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondrias, cloroplastos, vacuolas, etc., o a través de la ruta secretora). En determinadas 10 realizaciones, la proteína comprende una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítopos, una etiqueta FLAG, una etiqueta polihistidina, una fusión GST y similares.

Una ventaja de un aminoácido no natural es que presenta fracciones químicas adicionales que se pueden usar para 15 añadir moléculas adicionales. Estas modificaciones se pueden realizar *in vivo* en una célula eucariota o no eucariota o *in vitro*. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la modificación postraduccional es a través del aminoácido no natural. Por ejemplo, la modificación postraduccional puede ser a través de una reacción nucleófila-electrófila. La mayoría de las reacciones utilizadas actualmente para la modificación selectiva de proteínas implican la formación 20 de enlaces covalentes entre compañeros de reacción nucleófilos y electrófilos, incluyendo, pero no limitado a, la reacción de α -halocetonas con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en estos casos se determina por el número y la accesibilidad de las fracciones nucleófilas en la proteína. En las proteínas de la invención, se 25 pueden utilizar otras reacciones más selectivas tales como la reacción de un cetoaminoácido no natural con hidrazidas o compuestos de aminooxi, *in vitro* e *in vivo*. Véase, por ejemplo, Cornish y col., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal y col., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang y col., (2001) Science 292:498-500; Chin y col., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang y col., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56- 61; Zhang y col., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; y Chin y col., (2003) Science, 301:964-7. Esto permite el marcaje selectivo de prácticamente cualquier proteína con una serie de 30 reactivos incluyendo fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos y moléculas citotóxicas. Véase también, la patente de EE.UU. N.º 6.927.042 titulada "Glycoprotein synthesis". Además, se pueden realizar modificaciones postraduccionales, incluyendo, pero no limitado a, a través de un azido aminoácido, a través de la 35 ligación de Staudinger (incluyendo, pero no limitado a, con reactivos de triarilfosfina). Véase, por ejemplo, Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

Se desvela en el presente documento otro método altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas, que 40 implica la incorporación genética de aminoácidos no naturales incluyendo, pero no limitado a, los que contienen una porción azida o alquinilo en proteínas en respuesta a un codón selector. Estas cadenas laterales de aminoácidos se pueden modificar después, incluyendo, pero no limitado a, por una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, por ejemplo, Padwa, A. en Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y Huisgen, R. en 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, p. 1-176) incluyendo, pero no limitado a, con derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Como este método implica una cicloadición en lugar de una sustitución nucleófila, las proteínas se pueden modificar con selectividad extremadamente alta. Esta reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad ($1,4 > 1,5$) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, Tornoe y col., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; y Rostovtsev y col., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599. Otro método que se puede usar es el intercambio de ligando en un 45 compuesto biarsénico con un motivo de tetracisteína, véase, por ejemplo, Griffin y col., (1998) Science 281:269-272.

Una molécula que se puede añadir a una proteína a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier 50 molécula con un derivado de azida o alquinilo. Las moléculas incluyen, pero no se limitan a, colorantes, fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos, polímeros (incluyendo, pero no limitado a, derivados de polietilenglicol), fotorreticuladores, compuestos citotóxicos, marcadores de afinidad, derivados de biotina, resinas, perlas, una segunda proteína o polipéptido (o más), uno o más polinucleótidos (incluyendo, pero no limitado a, ADN,

ARN, etc.), quelantes metálicos, cofactores, ácidos grasos, carbohidratos y similares. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo alquinilo, incluyendo, pero no limitado a, p-propargiloxifenilalanina o grupo azido, incluyendo, pero no limitado a, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

5 **Generación *in vivo* de polipéptidos de relaxina que comprenden aminoácidos codificados de modo no natural**

Los polipéptidos de relaxina de la invención se pueden generar *in vivo* utilizando ARNt y ARNt sintetasas modificadas para añadir o sustituir aminoácidos que no están codificados en sistemas de origen natural.

10 Se describen métodos para generar ARNt y ARNt sintetasas que utilizan aminoácidos que no están codificados en sistemas de origen natural, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 7.045.337 y 7.083.970. Estos métodos implican generar una maquinaria de traducción que actúa independientemente de las sintetasas y ARNt endógenos del sistema de traducción (y se denominan, por lo tanto, en ocasiones "ortogonales"). normalmente, el sistema de traducción comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS). normalmente, la O-RS preferentemente aminoacila el O-ARNt con al menos un aminoácido no natural en el sistema de traducción y el O-ARNt reconoce al menos un codón selector que no es reconocido por otros ARNt en el sistema. El sistema de traducción inserta de ese modo el aminoácido codificado de modo no natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, "sustituyendo" así un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

20 Se ha descrito una amplia diversidad de ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas en la técnica para insertar aminoácidos sintéticos particulares en polipéptidos, y generalmente son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, se describen O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas cetoespecíficas en Wang, L. y col., Proc. 25 Natl. Acad. Sci. EUA 100:56-61 (2003) y Zhang, Z. y col., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003). Se codifican O-RS a modo de ejemplo, o partes de las mismas, por secuencias de polinucleótidos e incluyen las secuencias de aminoácidos desveladas en las patentes de EE.UU. N.º 7.045.337 y 7.083.970. También se describen las moléculas de O-ARNt correspondientes para su uso con las O-RS en las patentes estadounidenses N.º 7.045.337 y 7.083.970. Se describen otros ejemplos de pares O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas en los documentos WO 2005/007870, WO 30 2005/007624; y WO 2005/019415.

30 Se describe un ejemplo de un sistema de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específico de azida en Chin, J. W. y col., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002). Las secuencias de O-RS a modo de ejemplo para p-azido-L-Phe incluyen, pero no se limitan a, las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 14-16 y 29-32 y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 46-48 y 61-64 como se desvela en la patente de EE.UU. N.º 7.083.970. Las secuencias de O-ARNt a modo de ejemplo adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1-3 como se describe en la patente de EE.UU. N.º 7.083.970. Otros ejemplos de pares de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específicos para aminoácidos codificados de modo no natural particulares se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.045.337. Se describen O-RS y O-ARNt que incorporan aminoácidos que contienen ceto y azida en *S. cerevisiae* en Chin, J. W. y col., Science 301:964-967(2003).

40 Se han informado muchos otros pares ortogonales. Se han descrito sistemas de glutaminilo (véase, por ejemplo, Liu, D. R. y Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785), aspartilo (véase, por ejemplo, Pastrnak, M. y col., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286) y tirosilo (véase, por ejemplo, Ohno, S. y col., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; y Kowal, A. K. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) derivados de ARNt y sintetasas de *S. cerevisiae* para la incorporación potencial de aminoácidos no naturales en *E. coli*. Se han descrito sistemas derivados de glutaminilo (véase, por ejemplo, Kowal, A. K. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) y tirosilo (véase, por ejemplo, Edwards, H. y Schimmel, P, (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) sintetasas de *E. coli* para su uso en *S. cerevisiae*. El sistema de tirosilo de *E. coli* se ha utilizado para la incorporación de 3-yodo-L-tirosina *in vivo*, en células de mamífero. Véase Sakamoto, K. y col., (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699.

50 El uso de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas implica la selección de un codón específico que codifica el aminoácido codificado de modo no natural. Aunque se puede utilizar cualquier codón, generalmente es deseable seleccionar un codón que se use con poca frecuencia o nunca en la célula en la que se expresa el O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa. Por ejemplo, los codones a modo de ejemplo incluyen codones sin sentido tales como codones de parada (ámbar, ocre y ópalo), codones de cuatro o más bases y otros codones de tres bases naturales que no se usan o se usan con poca frecuencia.

60 Se pueden introducir codón o codones selectores específicos en posiciones apropiadas en la secuencia que codifica el polinucleótido de relaxina empleando los métodos de mutagénesis conocidos en la técnica (incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis específica del sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción, etc.).

65 Se describen métodos para generar componentes de la maquinaria biosintética de proteínas, tales como O-RS, O-ARNt y pares O-ARNt/O-RS ortogonales que se pueden usar para incorporar un aminoácido codificado de modo no natural en Wang, L. y col. Science 292: 498-500 (2001); Chin, J. W y col, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002);

- Zhang, Z. y col. *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Se describen métodos y composiciones para la incorporación *in vivo* de aminoácidos codificados de modo no natural en la patente de EE.UU. N.º 7.045.337, que se incorpora al presente por referencia. También se describen métodos para seleccionar un par ortogonal de ARNt-ARNt sintetasa para su uso en sistema de traducción *in vivo* de un organismo en las patentes de EE.UU. N.º 7.045.337 y 7.083.970.
- 5 La publicación de PCT N.º WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins", que se incorpora al presente por referencia en su totalidad, describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de cetoaminoácidos. La publicación de PCT N.º WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code", describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de aminoácidos codificados de modo no natural en células hospedadoras eucariotas.
- 10 Los métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (O-RS) comprenden: (a) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un primer organismo, incluyendo, pero no limitado a, un organismo procariota, tal como *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* o similares, o un organismo eucariota; (b) seleccionar (o explorar) en la biblioteca de RS (opcionalmente RS mutantes) miembros que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido codificado de modo no natural y un aminoácido natural, proporcionando de este modo un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); y/o (c) seleccionar (opcionalmente a través de selección negativa) el grupo para RS activas (incluyendo, pero no limitado a, RS mutantes) que preferentemente aminoacilan el O-ARNt en ausencia del aminoácido codificado de modo no natural, proporcionando de este modo la al menos una O-RS recombinante; en la que la al menos una O-RS recombinante aminoacila preferentemente el O-ARNt con el aminoácido codificado de modo no natural.
- 15 En una realización, la RS es una RS inactiva. La RS inactiva se puede generar mutando una RS activa. Por ejemplo, la RS inactiva se puede generar mutando al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6 o al menos aproximadamente 10 o más aminoácidos a aminoácidos diferentes, incluyendo, pero no limitado a, alanina.
- 20 Se pueden generar bibliotecas de RS mutantes utilizando diversos métodos conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, el diseño racional basado en la estructura de RS tridimensional proteica o la mutagénesis de nucleótidos de RS en una técnica de diseño racional o aleatorio. Por ejemplo, las RS mutantes se pueden generar por mutaciones específicas de sitio, mutaciones aleatorias, mutaciones de recombinación que generan diversidad, construcciones químicas, diseño racional y por otros métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.
- 25 En una realización, la selección (o exploración) en la biblioteca de RS (opcionalmente RS mutantes) de miembros que son activos, incluyendo, pero no limitado a, que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido codificado de modo no natural y un aminoácido natural, incluye: introducir un marcador de exploración o selección positiva, incluyendo, pero no limitado a, un gen de resistencia a antibióticos, o similares, y la biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) en una serie de células, en donde el marcador de exploración o selección positiva comprende al menos un codón selector, incluyendo, pero no limitado a, un codón ámbar, ocre u ópalo; cultivar la serie de células en presencia de un agente de selección; identificar las células que sobreviven (o que muestran una respuesta específica) en presencia del agente de selección o exploración suprimiendo el o los codones selectores en el marcador de exploración o selección positiva, proporcionando así un subconjunto de células seleccionadas de forma positiva que contienen el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes). Opcionalmente, la concentración del agente de selección o exploración se puede variar.
- 30 En un aspecto, el marcador de selección positiva es un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen CAT. Opcionalmente, el marcador de selección positiva es un gen de β-lactamasa y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen de β-lactamasa. En otro aspecto, el marcador de exploración positiva comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad (incluyendo, pero no limitado a, un marcador de superficie celular).
- 35 En una realización, la selección o exploración negativa del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que preferentemente aminoacilan el O-ARNt en ausencia del aminoácido codificado de modo no natural incluye: introducir un marcador de exploración o selección negativa con el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) de la selección o exploración positiva en una serie de células de un segundo organismo, en donde el marcador de exploración o selección negativa comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero no limitado a, un gen de resistencia a antibióticos, incluyendo, pero no limitado a, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)); e identificar células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio complementado con el aminoácido codificado de modo no natural y un agente de exploración o selección, pero que no sobreviven o no muestran la respuesta específica en un segundo medio no complementado con el aminoácido codificado de modo no natural y el agente de selección o exploración, proporcionando así células supervivientes o células exploradas con la o las O-RS recombinantes. Por ejemplo, un protocolo de identificación de CAT opcionalmente actúa como una selección positiva o una exploración negativa en la determinación de recombinantes de O-RS apropiados. Por ejemplo, se replica opcionalmente un grupo de clones en placas de cultivo que contienen

CAT (que comprende al menos un codón selector) con o sin uno o más aminoácidos codificados de modo no natural. Se considera, por lo tanto, que las colonias que se cultivan exclusivamente en las placas que contienen aminoácidos codificados de modo no natural contienen O-RS recombinante. En un aspecto, la concentración del agente de selección (o exploración) varía. En algunos aspectos, el primer y el segundo organismo son diferentes.

- 5 Por lo tanto, el primer o el segundo organismo opcionalmente comprende: un procariota, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc. En otras realizaciones, el marcador de exploración comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad.
- 10 En otra realización, la exploración o selección (incluyendo, pero no limitado a, la selección negativa) del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) incluye: aislar el grupo de RS mutantes activas de la etapa de selección positiva (b); introducir un marcador de exploración o selección negativa, en donde el marcador de exploración o selección negativa comprende al menos un codón selector (incluyendo, pero no limitado a, un gen marcador tóxico, incluyendo, pero no limitado a, un gen de ribonucleasa barnasa, que comprende al menos un codón selector) y el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) en una serie de células de un segundo organismo; e identificar las células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio no complementado con el aminoácido codificado de modo no natural, pero que no sobreviven o no muestran una respuesta de exploración específica en un segundo medio complementado con el aminoácido codificado de modo no natural, proporcionando así células supervivientes o exploradas con la o las O-RS recombinantes, en las
- 15 que la o las O-RS recombinantes son específicas para el aminoácido codificado de modo no natural. En un aspecto, el o los codones selectores comprenden aproximadamente dos o más codones selectores. Estas realizaciones pueden incluir opcionalmente aquellas en donde el o los codones selectores comprenden dos o más codones selectores y en donde el primer y el segundo organismo son diferentes (incluyendo, pero no limitado a, cada organismo es opcionalmente, incluyendo, pero no limitado a, un procariota, un eucariota, un mamífero, una *Escherichia coli*, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc.). Además, en algunos aspectos el marcador de selección negativa comprende un gen de ribonucleasa barnasa (que comprende al menos un codón selector). En otros aspectos, el marcador de exploración comprende opcionalmente un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad. En las presentes realizaciones, las exploraciones o selecciones incluyen opcionalmente variación de la
- 20 rigurosidad de exploración o selección.
- 25

30 En una realización, los métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (O-RS) pueden comprender además: (d) aislar la o las O-RS recombinantes; (e) generar un segundo conjunto de O-RS (opcionalmente mutadas) derivadas de la o las O-RS recombinantes; y (f) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se obtenga una O-RS mutada que comprende una capacidad para aminoacilar preferentemente el O-ARNt. Opcionalmente, se repiten las etapas de (d) a (f), incluyendo, pero no limitado a, al menos aproximadamente dos veces. En un aspecto, el segundo conjunto de O-RS mutadas derivadas de al menos una O-RS recombinante se puede generar por mutagénesis, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis aleatoria, mutagénesis específica de sitio, recombinación o una combinación de estas.

- 35 40 La rigurosidad de las etapas de selección/exploración, incluyendo, pero no limitado a, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de exploración/selección positivas y negativas (b) y (c), en los métodos descritos anteriormente, opcionalmente incluye variar la rigurosidad de selección/exploración. En otra realización, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de selección/exploración positivas y negativas (b) y (c) comprenden usar un indicador, en donde el indicador es detectado por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o en donde el indicador es detectado por luminiscencia. Opcionalmente, el indicador se presenta en una superficie celular, en una presentación de fagos o similares y se selecciona basándose en la afinidad o la actividad catalítica que involucra al aminoácido codificado de modo no natural o un análogo. En una realización, la sintetasa mutada se presenta en una superficie celular, en una presentación de fagos o similares.
- 45

- 50 Los métodos para producir un ARNt ortogonal (O-ARNt) recombinante incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt, incluyendo, pero no limitado a, un ARNt supresor, de un primer organismo; (b) seleccionar (incluyendo, pero no limitado a, seleccionar de forma negativa) o explorar la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) a partir de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); y (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal introducida (O-RS), proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante; en donde el o los O-ARNt recombinantes reconocen un codón selector y no son reconocidos eficazmente por la RS del segundo organismo y son aminoacilados preferentemente por la O-RS. En algunas realizaciones el al menos un ARNt es un ARNt supresor y/o comprende un codón de tres bases único de bases naturales y/o no naturales, o es un codón sin sentido, un codón raro, un codón no natural, un codón que comprende al menos 4 bases, un codón ámbar, un codón ocre o un codón de parada ópalo. En una realización, la O-ARNt recombinante posee una mejora de la ortogonalidad. Se apreciará que en algunas realizaciones, el O-ARNt se importa opcionalmente a un primer organismo desde un segundo organismo sin la necesidad de modificación. En diversas realizaciones, el primer y el segundo organismos son iguales o diferentes y se seleccionan opcionalmente,
- 55
- 60
- 65

entre otros, de procariotas (incluyendo, pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium*, *thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, etc.), eucariotas, mamíferos, hongos, levaduras, arqueobacterias, eubacterias, plantas, insectos, protistas, etc. Además, el ARNt recombinante se aminoacila opcionalmente por un aminoácido codificado de modo no natural, en donde el aminoácido codificado de modo no natural se biosintetiza *in vivo* de forma natural o a través de manipulación genética. Se añade opcionalmente el aminoácido codificado de modo no natural a un medio de cultivo para al menos el primer o el segundo organismo.

En un aspecto, la selección (incluyendo, pero no limitado a, la selección negativa) o la exploración de la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (etapa (b)) incluye: introducir un gen de marcador tóxico, en donde el gen de marcador tóxico comprende al menos uno de los codones selectores (o un gen que conduce a la producción de un agente tóxico o estático o un gen esencial para el organismo, en donde el gen marcador comprende al menos un codón selector) y la biblioteca de ARNt (opcionalmente mutantes) en una pluralidad de células del segundo organismo; y seleccionar las células supervivientes, en donde las células supervivientes contienen el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) que comprende al menos un ARNt ortogonal o un ARNt no funcional. Por ejemplo, se pueden seleccionar células supervivientes utilizando un ensayo de densidad celular de relación de comparación.

En otro aspecto, el gen de marcador tóxico puede incluir dos o más codones selectores. En otra realización de los métodos, el gen de marcador tóxico es un gen de ribonucleasa barnasa, en donde el gen de ribonucleasa barnasa comprende al menos un codón ámbar. Opcionalmente, el gen de ribonucleasa barnasa puede incluir dos o más codones ámbar.

En una realización, la selección o exploración del grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (O-RS) introducida puede incluir: introducir un gen marcador de selección o exploración positiva, en donde el gen marcador positivo comprende un gen de resistencia a fármacos (incluyendo, pero no limitado a, un gen de β -lactamasa, que comprende al menos uno de los codones selectores, tales como al menos un codón de parada ámbar) o un gen esencial para el organismo, o un gen que conduzca a la destoxicación de un agente tóxico, junto con la O-RS y el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) en una serie de células del segundo organismo; e identificar las células supervivientes o exploradas que se han cultivado en presencia de un agente de selección o exploración, incluyendo, pero no limitado a, un antibiótico, proporcionando así un grupo de células que poseen el o los ARNt recombinantes, en donde el o los ARNt recombinantes se aminoacilan por la O-RS e insertan un aminoácido en un producto de traducción codificado por el gen marcador positivo, en respuesta al o a los codones selectores. En otra realización, la concentración del agente de selección o exploración varía.

Se proporcionan métodos para generar pares O-ARNt/O-RS específicos. Los métodos incluyen: (a) generar una biblioteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt de un primer organismo; (b) seleccionar o explorar de forma negativa la biblioteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (O-RS) introducida, proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante. El al menos un O-ARNt recombinante reconoce un codón selector y no es reconocido eficazmente por la RS del segundo organismo y se aminoacila preferentemente por la O-RS. El método también incluye (d) generar una biblioteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un tercer organismo; (e) seleccionar o explorar la biblioteca de RS mutantes con respecto a miembros que aminoacilan preferentemente el o los O-ARNt recombinantes en presencia de un aminoácido codificado de modo no natural y un aminoácido natural, proporcionando así un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); y (f) seleccionar o explorar de forma negativa el grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que aminoacilan preferentemente el o los O-ARNt recombinantes en ausencia del aminoácido codificado de modo no natural, proporcionando así el o los pares de O-ARNt/O-RS específicos, en donde el o los pares de O-ARNt/O-RS específicos comprenden al menos una O-RS recombinante que es específica para el aminoácido codificado de modo no natural y el o los O-ARNt recombinantes. Se incluyen pares de O-ARNt/O-RS específicos producidos por los métodos. Por ejemplo, el par de O-ARNt/O-RS específico puede incluir, incluyendo, pero no limitado a, un par de mutARNtY-mutTyrRS, como un par de mutARNtY-SS12TyrRS, un par mutARNLeu-mutLeuRS, un par mutARNThr-mutThrRS, un par mutARNGlu-mutGluRS o similares. Además, se incluyen métodos en los que el primer y el tercer organismo son iguales (incluyendo, pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*).

También se incluyen en la presente invención métodos para seleccionar un par de ARNt ortogonal-ARNt sintetasa para su uso en un sistema de traducción *in vivo* de un segundo organismo. Los métodos incluyen: introducir un gen marcador, un ARNt y una aminocil-ARNt sintetasa (RS) aislados o derivados de un primer organismo en un primer conjunto de células del segundo organismo; introducir el gen marcador y el ARNt en un conjunto de células duplicadas de un segundo organismo; y seleccionar en el primer conjunto células supervivientes que no sobrevivan en el conjunto de células duplicadas o explorar células que muestren una respuesta de exploración específica que no proporcionen la respuesta en el conjunto de células duplicadas, en donde el primer conjunto y el conjunto de células duplicadas se cultivan en presencia de un agente de selección o exploración, en donde las células supervivientes o exploradas comprenden el par de ARNt-ARNt sintetasa ortogonal para su uso en el sistema de traducción *in vivo* del segundo organismo. En una realización, la comparación y selección o exploración incluye un

ensayo de complementación *in vivo*. La concentración del agente de selección o exploración puede variar.

Los organismos de la presente invención comprenden diversos organismos y diversas combinaciones. Por ejemplo, el primer y el segundo organismos de los métodos de la presente invención pueden ser el mismo o diferentes. En una realización, los organismos son opcionalmente un organismo procariota, incluyendo, pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* o similares. Como alternativa, los organismos comprenden opcionalmente un organismo eucariota, incluyendo, pero no limitado a, plantas (incluyendo, pero no limitado a, plantas complejas tales como monocotiledóneas o dicotiledóneas), algas, protistas, hongos, (incluyendo, pero no limitado a, levadura, etc.), animales (incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, insectos, artrópodos, etc.) o similares. En otra realización, el segundo organismo es un organismo procariota, incluyendo, pero no limitado a, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus* o similares. Como alternativa, el segundo organismo puede ser un organismo eucariota incluyendo, pero no limitado a, una levadura, una célula animal, una célula vegetal, un hongo, una célula de mamífero o similares. En diversas realizaciones, el primer y el segundo organismo son diferentes.

Localización de aminoácidos no naturales en polipéptidos de relaxina

La presente invención contempla la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en polipéptidos de relaxina. Se puede incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una posición particular que no interrumpe la actividad del polipéptido. Esto se puede lograr haciendo sustituciones "conservativas" incluyendo, pero no limitado a, sustituyendo aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófobos, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos hidrófilos o insertando el aminoácido no natural en una localización que no se requiere para la actividad.

Se pueden emplear diversos enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido codificado de modo no natural dentro del polipéptido de insulina. Resultará evidente para los expertos en la materia que cualquier posición de la cadena de polipéptidos es adecuada para la selección para incorporar un aminoácido codificado de modo no natural, y la selección puede basarse en el diseño racional o por selección aleatoria con respecto a cualquier fin deseado o ninguno en particular. La selección de sitios deseados puede ser para producir una molécula de relaxina que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo, pero no limitado a, agonistas, superagonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores de unión al receptor, moduladores de la actividad del receptor, formación de dímeros o multímeros, sin cambios en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa o manipular cualquier propiedad física o química del polipéptido como la solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, se pueden identificar las localizaciones en el polipéptido requeridas para la actividad biológica de los polipéptidos de relaxina utilizando análisis de mutación puntual, exploración de alanina, mutagénesis de saturación y exploración con respecto a la actividad biológica o procesos de exploración homólogos conocidos en la técnica. Otros métodos que se pueden utilizar para identificar restos para la modificación de los polipéptidos de relaxina incluyen, pero no se limitan, perfilado de secuencias (Bowie y Eisenberg, *Science* 253(5016): 164-70, (1991)), selecciones de biblioteca de rotámeros (Dahiyat y Mayo, *Protein Sci* 5(5): 895-903 (1996); Dahiyat y Mayo, *Science* 278(5335): 82-7 (1997); Desjarlais y Handel, *Protein Science* 4: 2006-2018 (1995); Harbury y col., *PNAS EUA* 92(18): 8408-8412 (1995); Kono y col., *Proteins: Structure, Function and Genetics* 19: 244-255 (1994); Hellinga y Richards, *PNAS EUA* 91: 5803-5807 (1994)); y potenciales de pares de restos (Jones, *Protein Science* 3: 567-574, (1994)) y diseño racional utilizando la tecnología Protein Design Automation®. (Véase las patentes de EE.UU. N.º 6.188.965; 6.269.312; 6.403.312; WO98/47089). Se pueden mutar restos que son fundamentales para la bioactividad de la relaxina, restos que afectan la estabilidad farmacéutica, epítopos de anticuerpos o restos de unión al receptor. Las patentes de EE.UU. N.º 5.580.723; 5.834.250; 6.013.478; 6.428.954 y 6.451.561 describen métodos para el análisis sistemático de la estructura y la función de polipéptidos tales como la relaxina identificando dominios activos que influyen en la actividad del polipéptido con una sustancia diana. Los restos distintos de los identificados como fundamentales para la actividad biológica por mutagénesis de exploración de alanina u homóloga pueden ser buenos candidatos para su sustitución con un aminoácido codificado de modo no natural dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Alternativamente, los sitios identificados como fundamentales para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para sustitución con un aminoácido codificado de modo no natural, dependiendo de nuevo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente realizar sustituciones seriadas en cada posición en la cadena de polipéptidos con un aminoácido codificado de modo no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Resulta fácilmente evidente para los expertos en la materia que cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en la presente invención.

También se pueden examinar la estructura y la actividad de los mutantes de polipéptidos de relaxina que contienen eliminaciones para determinar regiones de la proteína que son probablemente tolerantes a sustitución con un aminoácido codificado de modo no natural. De manera similar, se pueden utilizar digestión con proteasa y anticuerpos monoclonales para identificar regiones de relaxina que son responsables de la unión con el receptor de relaxina. Una vez que se han eliminado los restos que probablemente sean intolerantes a sustitución con

aminoácidos codificados de modo no natural, se puede examinar el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes. Se pueden generar modelos a partir de las estructuras cristalinas tridimensionales de otros miembros de la familia de relaxina y los receptores de relaxina. El Banco de Datos de Proteínas (PDB, disponible en Internet en rcsb.org) es una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos. Se pueden realizar los modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no hay datos estructurales tridimensionales disponibles. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden identificar fácilmente posiciones de aminoácidos que se pueden sustituir con aminoácidos codificados de modo no natural.

Cadena A de relaxina		accesibilidad de disolvente complejo			Interfaz cadena A/B		
Nombre de resto	N.º resto/SEQ ID NO: 1	Resto Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio	Resto Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio
LEU	2	2,393927	2,336841	2,451013	0,00913	0,018259	0
TYR	3	1,05745	1,412109	0,880121	0,448218	0,164923	0,589865
SER	4	2,039557	1,726208	2,666253	0,094701	0,127334	0,029435
ALA	5	1,47603	1,32887	2,064669	0,040922	0,051152	0
LEU	6	0,520247	0,621696	0,418798	0,174242	0,189235	0,159248
ALA	7	0,476043	0,450361	0,578769	0,512186	0,474717	0,662064
ASN	8	1,252271	0,865912	1,638629	0,32958	0,460124	0,199036
LYS	9	0,886439	0,727133	1,013884	0,424786	0,531522	0,339397
CYS	10	0,307912	0,414588	0,094561	0,731348	0,802621	0,588801
CYS	11	0,791671	0,774527	0,825959	1,267628	1,170385	1,462113
HIS	12	1,644891	1,389182	1,815363	0,902367	0,910146	0,897182
VAL	13	1,432029	1,329367	1,568911	0,865782	1,041144	0,631966
GLY	14	0,721258	0,721258	0	0,814179	0,814179	0
CYS	15	0,405285	0,470822	0,274212	0,79239	0,856379	0,664412
THR	16	0,511268	0,367613	0,702808	1,096358	1,011865	1,209014
LYS	17	0,376592	0,233542	0,491032	2,691742	1,414171	3,713799
ARG	18	0,97893	0,478638	1,264811	1,626733	1,12903	1,911135
SER	19	0,416177	0,424198	0,405482	0,476934	0,49423	0,453873
LEU	20	0,155542	0,267306	0,043778	0,735924	0,711222	0,760627
ALA	21	0,478645	0,507787	0,362075	1,105314	1,045545	1,344386
ARG	22	1,273184	1,102102	1,370945	0,551495	0,572567	0,539454
PHE	23	1,054989	1,153619	0,998629	0,428106	0,829454	0,198764
CYS	24	1,352353	1,506838	1,146374	2,07439	2,22276	1,876563

Cadena B de relaxina		accesibilidad de disolvente complejo			Interfaz cadena A/B		
Nombre de resto	N.º resto/SEQ ID NO: 2	Resto Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio	Resto Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio
SER	2	2,241497	2,362674	1,999142	1,249697	1,108926	1,531239
TRP	3	1,036157	1,320435	0,922445	0,774516	1,009561	0,680498
MET	4	0,765903	0,783709	0,748097	1,378683	1,318601	1,438766
GLU	5	1,401968	1,102195	1,641786	1,60857	1,38927	1,784009
GLU	6	1,209446	0,935167	1,428869	0,994341	1,251666	0,788481
VAL	7	1,123345	1,08403	1,175766	1,917498	1,613757	2,322484
ILE	8	0,478044	0,594216	0,361873	1,329975	1,726264	0,933686
LYS	9	1,135226	0,723724	1,464427	2,332893	1,427852	3,056925
LEU	10	0,579	0,504927	0,653072	0,906043	1,195675	0,616411

(continuación)

CYS	11	0,862862	0,806072	0,976442	1,030881	0,795964	1,500714
GLY	12	1,089858	1,089858	0	0,604306	0,604306	0
ARG	13	3,079311	1,482092	3,992007	0,024047	0,066128	0
GLU	14	1,46883	0,992251	1,680643	0,137036	0,204496	0,107054
LEU	15	0,378917	0,508368	0,249467	0,743117	0,470105	1,016129
VAL	16	1,018006	0,820163	1,281796	0,279417	0,29034	0,264852
ARG	17	1,660023	0,937977	2,072621	0,048147	0,132403	0
ALA	18	0,51055	0,547669	0,362075	0,379088	0,387335	0,346101
GLN	19	0,436502	0,481692	0,400351	1,12185	0,733873	1,432231
ILE	20	1,321723	0,993689	1,649758	0,294635	0,473331	0,115939
ALA	21	1,001017	0,958569	1,170807	0,362917	0,40431	0,197346
ILE	22	0,381207	0,565133	0,197281	0,689578	0,665212	0,713943
CYS	23	0,888302	0,931778	0,80135	0,782559	0,685197	0,977284
GLY	24	1,608804	1,608804	0	0,25224	0,25224	0
MET	25	1,419412	1,489301	1,349524	0,239722	0,18572	0,293724
SER	26	1,07028	1,249672	0,711497	0,582382	0,433677	0,879791
THR	27	2,199516	2,265998	2,110873	0,228179	0,155968	0,32446
TRP	28	4,74167	3,651826	4,971111	0	0	0

En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina de la invención comprenden uno o más aminoácidos codificados de modo no natural situados en una región de la proteína que no rompe la estructura del polipéptido.

- 5 Pueden ser restos a modo de ejemplo de incorporación de un aminoácido codificado de modo no natural los que se excluyen de regiones de unión al receptor potenciales, pueden estar completa o parcialmente expuestos al disolvente, tener interacciones de enlaces de hidrógeno mínimas o nulas con los restos cercanos, pueden estar expuestos mínimamente a restos reactivos cercanos, pueden estar en una o más de las caras expuestas, pueden ser un sitio o sitios que se yuxtaponen a una segunda relaxina, u otra molécula o fragmento esta, pueden estar en regiones que son altamente flexibles o estructuralmente rígidas, según se predice por la estructura tridimensional, secundaria, terciaria, o cuaternaria de relaxina, unida o no unida a su receptor, o acoplados o no acoplados a otra molécula biológicamente activa, o pueden modular la conformación de la relaxina en sí misma o dímero o multímero que comprende una o más relaxinas, alterando la flexibilidad o rigidez de la estructura completa según se deseé.
- 10 15 Un experto en la materia reconoce que el análisis de relaxina permite la determinación de los restos de aminoácidos que están expuestos en la superficie en comparación con los restos de aminoácidos que están enterrados dentro de la estructura terciaria de la proteína. Por lo tanto, es una realización de la presente invención sustituir con un aminoácido codificado de modo no natural un aminoácido que es un resto expuesto en la superficie.
- 20 25 30 Un examen de la estructura cristalina de la relaxina y su interacción con el receptor de relaxina puede indicar qué restos de aminoácidos específicos tienen cadenas laterales que son completa o parcialmente accesibles al disolvente. La cadena lateral de un aminoácido codificado de modo no natural en estas posiciones puede apuntar en sentido contrario a la superficie proteica y salir hacia el disolvente.
- 35 40 En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras, las posiciones: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID NO: 1) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID NO: 2).
- En algunas realizaciones, el aminoácido codificado de modo no natural en una o más de estas posiciones está enlazado a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras, las posiciones: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID NO: 1) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID NO: 2).
- Una gran diversidad de aminoácidos codificados de modo no natural pueden sustituir a, o incorporarse en, una

posición dada en un polipéptido de relaxina. En general, se selecciona un aminoácido codificado de modo no natural particular para la incorporación basándose en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido de relaxina u otro miembro de la familia de relaxina o análogo de relaxina con su receptor, una preferencia por sustituciones conservativas (es decir, aminoácidos codificados de modo no natural a base de arilo, tales como p-acetilfenilalanina u O-propargiltirosina que sustituyen a Phe, Tyr o Trp) y la química de conjugación específica que se desea introducir en el polipéptido de relaxina (por ejemplo, la introducción de 4-azidofenilalanina si se desea efectuar una cicloadición de Huisgen [3+2] con un polímero soluble en agua que contiene una porción alquino o la formación de un enlace amida con un polímero soluble en agua que contiene un aril éster que, a su vez, incorpora una porción de fosfina).

En un caso, el método incluye además incorporar en la proteína el aminoácido no natural, en donde el aminoácido no natural comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto la proteína con una molécula (incluyendo, pero no limitado a, un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietenglicol, un fotorreticulador, un radionúclido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, 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 sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de spin, un fluoróforo, una porción que contiene metal, una porción radiactiva, un grupo funcional nuevo, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, una porción fotoliberadora, una porción excitable por radiación actínica, una porción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una porción que incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, una porción tóxica, una porción marcada de forma isotópica, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo de intercalación, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionúclido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones o cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro compuesto o sustancia deseable) que comprende un segundo grupo reactivo. El primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo para unir la molécula al aminoácido no natural a través de una cicloadición [3+2]. En una realización, el primer grupo reactivo es una porción alquinilo o azido y el segundo grupo reactivo es una porción azido o alquinilo. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es la porción alquinilo (incluyendo, pero no limitado a, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la porción azido. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es la porción azido (incluyendo, pero no limitado a, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la porción alquinilo.

En algunos casos, la sustitución o sustituciones de aminoácidos codificados de modo no natural se combinarán con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido de relaxina para afectar otros rasgos biológicos del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad (incluyendo, pero no limitado a, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido de relaxina o aumentar la afinidad del polipéptido de relaxina por su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden potenciar la actividad antivírica del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo, pero no limitado a, cuando se expresa en *E. coli* u otras células hospedadoras) del polipéptido de relaxina. En algunos casos las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido de relaxina después de expresión en *E. coli* u otras células hospedadoras recombinantes. En algunos casos los sitios se seleccionan para sustitución con un aminoácido no natural o codificado de modo no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado un aumento de la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli* u otras células hospedadoras recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad por el receptor del polipéptido de relaxina, proteínas de unión o ligando asociado, modula la transducción de señales después de la unión con el receptor de relaxina, modula la vida media en circulación, modula la liberación o la biodisponibilidad, facilita la purificación o mejora o altera una vía particular de administración. En algunos casos, los polipéptidos de relaxina comprenden una adición, sustitución o eliminación que aumenta la afinidad de la variante de relaxina por su receptor. De igual modo, los polipéptidos de relaxina pueden comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluyendo, pero no limitado a, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluyendo, pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo, pero no limitado a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo, pero no limitado a, GFP), la purificación, el transporte a través de tejidos o membranas celulares, la liberación o activación de profármacos, la reducción del tamaño de relaxina u otros rasgos del polipéptido.

En algunos casos, la sustitución de un aminoácido codificado de modo no natural genera un antagonista de relaxina. En algunos casos, se sustituye o añade un aminoácido codificado de modo no natural en una región implicada en la unión con el receptor. En algunos casos, los antagonistas de la relaxina comprenden al menos una sustitución que provoca que la relaxina actúe como un antagonista. En algunas realizaciones, el antagonista de relaxina comprende

un aminoácido codificado de modo no natural enlazado a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión al receptor de la molécula de relaxina.

En algunos casos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos se sustituyen por uno o más aminoácidos codificados de modo no natural. En algunos casos, el polipéptido de relaxina incluye además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de uno o más aminoácidos codificados de modo no natural por aminoácidos naturales. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más restos en la relaxina se sustituyen por uno o más aminoácidos codificados de modo no natural. En algunos casos, el uno o más restos codificados de modo no natural se unen a uno o más PEG lineales o ramificados de peso molecular más bajo, potenciando así la afinidad de unión y la vida media en suero comparable con respecto a las especies unidas a un solo PEG de mayor peso molecular.

En algunas realizaciones, hasta dos de los siguientes restos de relaxina se sustituyen por uno o más aminoácidos codificados de modo no natural.

15 *Expresión en no eucariotas y eucariotas*

Para obtener expresión de alto nivel de un polinucleótido de relaxina clonado, normalmente se subclonan polinucleótidos que codifican un polipéptido de relaxina de la invención en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y, si es para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son conocidos por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. y Ausubel y col.

Los sistemas de expresión bacterianos para expresar polipéptidos de relaxina de la invención están disponibles, incluyendo, pero no limitado a, en *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella* (Palva y col., Gene 22:229-235 (1983); Mosbach y col., Nature 302:543-545 (1983)). Hay kits disponibles en el mercado para estos sistemas de expresión. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamífero, levadura y células de insecto son conocidos por los expertos en la materia y también están disponibles en el mercado. En los casos en los que se utilizan ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas (descritos anteriormente) para expresar los polipéptidos de relaxina de la invención, se seleccionan las células hospedadoras para expresión basándose en su capacidad para usar los componentes ortogonales. Las células hospedadoras a modo de ejemplo incluyen bacterias Gram-positivas (incluyendo, pero no limitado a, *B. brevis*, *B. subtilis* o *Streptomyces*) y bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), así como levadura y otras células eucariotas. Las células que comprenden pares de O-ARNt/O-RS se pueden utilizar como se describe en el presente documento.

Una célula hospedadora eucariota o célula hospedadora no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad de sintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. En un aspecto, la composición incluye opcionalmente, incluyendo, pero no limitado a, al menos 10 microgramos, al menos 50 microgramos, al menos 75 microgramos, al menos 100 microgramos, al menos 200 microgramos, al menos 250 microgramos, al menos 500 microgramos, al menos 1 milígramo, al menos 10 miligramos, al menos 100 miligramos, al menos un gramo o más de la proteína que comprende un aminoácido no natural, o una cantidad que se puede obtener con métodos de producción de proteínas *in vivo* (en el presente documento se proporcionan detalles sobre la producción y purificación de proteínas recombinantes). En otro aspecto, la proteína está opcionalmente presente en la composición a una concentración de, incluyendo, pero no limitado a, al menos 10 microgramos de proteína por litro, al menos 50 microgramos de proteína por litro, al menos 75 microgramos de proteína por litro, al menos 100 microgramos de proteína por litro, al menos 200 microgramos de proteína por litro, al menos 250 microgramos de proteína por litro, al menos 500 microgramos de proteína por litro, al menos 1 milígramo de proteína por litro o al menos 10 miligramos de proteína por litro o más, incluyendo, pero no limitado a, en un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (incluyendo, pero no limitado a, en un volumen de, incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de aproximadamente 1 nl a aproximadamente 100 l o más). La producción de grandes cantidades (incluyendo, pero no limitado a, mayores que las normalmente posibles con otros métodos, incluyendo, pero no limitado a, traducción *in vitro*) de una proteína en una célula eucariota que incluye al menos un aminoácido no natural es una característica de la invención.

Una célula hospedadora eucariota o célula hospedadora no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad de biosintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. Por ejemplo, se pueden producir proteínas que comprenden un aminoácido no natural a una concentración de, incluyendo, pero no limitado a, al menos 10 µ/litro, al menos 50 µ/litro, al menos 75 µ/litro, al menos 100 µ/litro, al menos 200 µ/litro, al menos 250 µ/litro o al menos 500 µ/litro, al menos 1 mg/litro, al menos 2 mg/litro, al menos 3 mg/litro, al menos 4 mg/litro, al menos 5 mg/litro, al menos 6 mg/litro, al menos 7 mg/litro, al menos 8 mg/litro, al menos 9 mg/litro, al menos 10 mg/litro, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/litro, 1 g/litro, 5 g/litro, 10 g/litro o más de proteína en un extracto celular, lisado celular, medio de cultivo, tampón o similares.

Hay varios vectores adecuados para la expresión de la relación disponible en el mercado. Los vectores de

expresión útiles para los hospedadores eucariotas, incluyen, pero no se limitan a, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Tales vectores incluyen pCDNA3.1(+)Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) y pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., USA). Pueden usarse plásmidos bacterianos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pBR322, pET3a y pET12a, 5 plásmidos de intervalo de hospedador más amplio, tales como RP4, ADN de fago, por ejemplo, los numerosos derivados de fago lambda, por ejemplo, NM989 y otros ADN de fago, tales como M13 y ADN de fago de cadena 10 única filamentosos. Se pueden utilizar el plásmido 2 μ y derivados del mismo, el vector POT1 (patente de EE.UU. N.º 4.931.373), el vector pJSO37 descrito en (Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202 207, 1996) y pPICZ A, B o C (Invitrogen) con células hospedadoras de levadura. Para las células de insecto, los vectores incluyen, pero no se 15 limitan a, pVL941, pBG311 (Cate y col., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685 98 (1986), pBluebac 4.5 y pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

15 La secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina también puede incluir, o no, una secuencia que codifica un péptido señal. El péptido señal está presente cuando el polipéptido va a ser secretado de las células en las cuales se expresa. Tal péptido señal puede ser cualquier secuencia. El péptido señal puede ser procariota o eucariota. Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89 104) describe un péptido señal para usar en células de mamífero (péptido señal de cadena ligera kappa de Ig murina). Otros péptidos señal incluyen, entre otros, el péptido 20 señal factor α de *S. cerevisiae* (patente de EE.UU. N.º 4.870.008), el péptido señal de amilasa salival de ratón (O. Hagenbuchle y col., Nature 289, 1981, pp. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (L. A. Valls y col., Cell 48, 1987, pp. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (WO 87/02670, que se incorpora al presente por referencia) y péptido señal de proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani y col., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

25 Los ejemplos de células hospedadoras mamíferas adecuadas son conocidos por los expertos en la materia. Tales células hospedadoras pueden ser células ováricas de hámster chino (CHO), (por ejemplo CHO-K1; ATCC CCL-61), células de mono verde (COS) (por ejemplo COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (por ejemplo NS/O), líneas celulares de riñón de hámster bebé (BHK) (por ejemplo ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10) y células humanas (por ejemplo HEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células vegetales en cultivo tisular. 30 Estas líneas celulares y otras están disponibles en depósitos públicos como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Para proporcionar una glucosilación mejorada del polipéptido de relaxina, se puede modificar una célula hospedadora mamífera para expresar sialiltransferasa, por ejemplo 1,6-sialiltransferasa, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.047.335.

35 Los métodos para la introducción de ADN exógeno en células hospedadoras mamíferas incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposoma, vectores víricos y los métodos de transfección descritos por Life Technologies Ltd, Paisley, RU utilizando Lipofectamin 2000 y Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA utilizando FuGENE 6. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y fueron descritos por Ausbel y col. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. El cultivo de células mamíferas se 40 puede realizar de acuerdo con los métodos establecidos, por ejemplo como se describe en (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, editado por Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA y Harrison Mass. y Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997).

Sistemas de expresión, cultivo y aislamiento

45 Se pueden expresar los polipéptidos de relaxina en diversos sistemas de expresión adecuados incluso, por ejemplo, levadura, células de insecto, células de mamífero y bacterias. Se proporciona a continuación una descripción de los sistemas de expresión a modo de ejemplo.

50 **Levadura.** Como se usa en el presente documento, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras capaces de expresar un gen que codifica un polipéptido de relaxina. Estas levaduras incluyen, pero no se limitan a, levaduras ascosporógenas (Endomycetales), levaduras basidiosporógenas y levaduras que pertenecen al grupo de hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Las levaduras ascosporógenas se dividen en dos familias, *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. La segunda comprende cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoideae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*, *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* y *Saccharomycoideae* (por ejemplo, géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidiosporógenas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* y *Filobasidiella*. Las levaduras que pertenecen al grupo de los hongos imperfectos (*Blastomycetes*) se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, géneros *Sporobolomyces* y *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, género *Candida*).

60 Son de particular interés para el uso con la presente invención las especies dentro de los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* y *Candida*, incluyendo, pero no limitado a, *P. pastoris*, *P. guillermondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* y *H. polymorpha*.

65 La selección de una levadura adecuada para la expresión de polipéptidos de relaxina está dentro de la habilidad de

los expertos en la materia. Al seleccionar hospedadores de levadura para la expresión, los hospedadores adecuados pueden incluir los que se ha demostrado que tienen, por ejemplo, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, buena capacidad de secreción, buena producción de proteína soluble y resistencia global. Las levaduras están disponibles en general en diversas fuentes, incluyendo, pero no limitado a, el Centro de Estirpes Genéticas de 5 Levadura, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) (Manassas, VA).

La frase "hospedador de levadura" o "célula hospedadora de levadura" incluye levadura que se puede utilizar, o se ha utilizado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. El término incluye la descendencia de la célula hospedadora de levadura original que ha recibido los vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. Se entiende que la descendencia de una sola célula parenteral puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es lo suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición. 10 15

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, incluyendo replicones extracromosómicos o vectores de integración, para la transformación en muchos hospedadores de levadura. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para *S. cerevisiae* (Sikorski y col., GENETICS (1989) 122:19; Ito y col., J. BACTERIOL. (1983) 20 153:163; Hinnen y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz y col., MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *H. polymorpha* (Gleeson y col., J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp y col., MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das y col., J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt y col., J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg y col., BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); *P. guillermondi* (Kunze y col., J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *P. pastoris* (patentes de EE.UU. N.º 5.324.639; 4.929.555; y 4.837.148; Cregg y col., MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y col., NATURE (1982) 300:706); e *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance y col., BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn y col., GENE (1983) 26:205-221; y Yelton y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesiae* (EP 0 244 234); y hongos filamentosos como, por ejemplo, 30 *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357).

Las secuencias de control para vectores de levadura son conocidas por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, regiones promotoras de genes tales como alcohol deshidrogenasa (ADH) (EP 0 284 044); enolasa; glucokinasa; glucosa-6-fosfato isomerasa; gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH); hexoquinasa; fosfofructoquinasa; 3-fosfoglicerato mutasa; y piruvato quinasa (PyK) (EP 0 329 203). El gen PHO5 de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, también puede proporcionar secuencias promotoras útiles (Miyanohara y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). Otras secuencias promotoras adecuadas para el uso con hospedadores de levadura pueden incluir los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073); y otras enzimas glucolíticas, como piruvato descarboxilasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglucosa 40 isomerasa (Holland y col., BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess y col., J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). Los promotores de levadura inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de cultivo pueden incluir las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2; isocitocromo C; fosfatasa ácida; metalotioneína; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno; y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y 45 promotores adecuados para el uso en la expresión de levaduras en EP 0 073 657.

También se pueden utilizar potenciadores de levadura con promotores de levadura. Además, los promotores sintéticos también pueden actuar como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de activación cadena arriba (UAS, por sus siglas en inglés) de un promotor de levadura se pueden unir con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor de híbrido sintético. Los ejemplos de los promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH unida a la región de activación de la transcripción de GAP. Véase, las patentes de EE.UU. N.º 4.880.734 y 4.876.197. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen los promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PHO5, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glucolítica como GAP o PyK. Véase EP 0 164 55 556. Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de origen natural no procedentes de levadura que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción.

Otros elementos de control que pueden comprender parte de los vectores de expresión de levadura incluyen terminadores, por ejemplo, de GAPDH o los genes de enolasa (Holland y col., J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385). Además, el origen de replicación del origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura. Un gen de selección adecuado para el uso en levadura es el gen trp1 presente en el plásmido de levadura. Véase Tschumper y col., GENE (1980) 10:157; Kingsman y col., GENE (1979) 7:141. El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura sin la capacidad de crecer en triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por plásmidos conocidos que portan el gen Leu2. 60 65

Los métodos para introducir ADN exógeno en hospedadores de levadura son conocidos por los expertos en la

5 materia y normalmente incluyen, entre otros, la transformación de esferoplastos o de células hospedadoras de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Por ejemplo, la transformación de levadura se puede llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en Hsiao y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 y Van Solingen y col., J. BACT, (1977) 130:946. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como por inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplastos como se describe en general en SAMBROOK y col., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Las células hospedadoras de levadura después se pueden cultivar utilizando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

10 Otros métodos para expresar proteínas heterólogas en células hospedadoras de levadura son conocidos por los expertos en la materia. Véase, en general, la publicación de patente de EE.UU. N.º 20020055169, las patentes de EE.UU. N.º 6.361.969; 6.312.923; 6.183.985; 6.083.723; 6.017.731; 5.674.706; 5.629.203; 5.602.034; y 5.089.398; las patentes reexaminadas de EE.UU. N.º RE37.343 y RE35.749; las solicitudes de patente publicadas de PCT WO 99/07862; WO 98/37208; y WO 98/26080; las solicitudes de patente europeas EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; y EP 0 164 556. Véase además Gellissen y col., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(I-2):79-93; Romanos y col., YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7.

20 Las cepas hospedadoras de levadura se pueden cultivar en fermentadores durante la fase de amplificación utilizando métodos de fermentación semicontinuos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de fermentación se pueden adaptar para responder a las diferencias en la ruta de uso de carbono de un hospedador de levadura particular o modo de control de la expresión. Por ejemplo, la fermentación de un hospedador de levadura de *Saccharomyces* puede requerir un único suministro de glucosa, una fuente de nitrógeno compleja (por ejemplo, hidrolisados de caseína) y complementación con múltiples vitaminas. Por el contrario, la levadura metilotrófica *P. pastoris* puede requerir suministros de glicerol, metanol y pequeñas cantidades de minerales, pero solo sales de amonio sencillas (nitrógeno) para un cultivo y expresión óptimos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.324.639; Elliott y col., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; y Fieschko y col., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113.

30 Estos métodos de fermentación, sin embargo, pueden tener determinadas características comunes independientes de la cepa hospedador de levadura empleada. Por ejemplo, se puede añadir un nutriente limitante del crecimiento, normalmente carbono, al fermentador durante la fase de amplificación para permitir el crecimiento máximo. Además, los métodos de fermentación generalmente emplean un medio de fermentación diseñado para contener cantidades adecuadas de carbono, nitrógeno, sales basales, fósforo y otros nutrientes menores (vitaminas, minerales en cantidades muy pequeñas y sales, etc.). Se describen ejemplos de medios de fermentación adecuados para el uso 35 con *Pichia* en las patentes de EE.UU. N.º 5.324.639 y 5.231.178.

40 **Células de insecto infectadas por baculovirus.** El término "hospedador de insecto" o "célula hospedadora de insecto" se refiere a un insecto que se puede utilizar, o se ha utilizado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. El término incluye la descendencia de la célula hospedadora de insecto original que se ha transfecido. Se entiende que la descendencia de una sola célula parenteral puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es lo suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición. La expresión de baculovirus de los polipéptidos de relaxina resulta útil en la presente invención y el uso de tecnología de ADNr, sus polipéptidos o precursores porque la relaxina puede ser biosintetizada en cualquier cantidad de células hospedadoras incluido bacterias, células de mamífero, células de insecto, levadura u hongos. Una realización de la presente invención incluye la biosíntesis de la relaxina, relaxina modificada, polipéptidos de relaxina o análogos de relaxina en bacterias, levadura o células de mamífero. Otra realización de la presente invención comprende la biosíntesis realizada en *E. coli* o una levadura. Ejemplos de biosíntesis en células de mamífero y animales transgénicos se describen en Hakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69, (1997)].

55 La selección de células de insecto adecuadas para la expresión de polipéptidos de relaxina es conocida por los expertos en la materia. En la técnica, se han descrito detalladamente varias especies de insectos y están disponibles en el mercado incluido *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Al seleccionar hospedadores de insectos para la expresión, los hospedadores adecuados pueden incluir los que han demostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica y resistencia global. Los insectos están disponibles en general en diversas fuentes, incluyendo, pero no limitado a, el Centro de Estirpes Genéticas de Insectos, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA).

60 En general, los componentes de un sistema de expresión de insectos infectados por baculovirus incluyen un vector de transferencia, generalmente un plásmido bacteriano, que contiene un fragmento del genoma de baculovirus y un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen heterólogo que se expresará; un baculovirus de tipo silvestre con secuencias homólogas al fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto posibilita la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma de baculovirus); y células hospedadoras de

insecto y medios de cultivo adecuados. Los materiales, métodos y técnicas utilizados en la construcción de vectores, transfección de células, selección de placas, crecimiento de células en cultivo y similares son conocidas en la técnica y hay manuales disponibles que describen estas técnicas.

- 5 Despues de insertar el gen heterólogo en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico de tipo silvestre se transfectan a una célula hospedadora de insecto en donde el vector y el genoma vírico se recombinan. El virus recombinante empaquetado se expresa y se identifican y purifican placas recombinantes. Están disponibles en el mercado los materiales y los métodos para los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus en forma de kit, por ejemplo, de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Estas técnicas en general son conocidas por los expertos en la materia y se describen completamente en SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN N.º 1555 (1987). Véase además, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING y POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); y O'REILLY y col., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).
- 10 15 De hecho, la producción de diversas proteínas heterólogas utilizando sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus es conocida por los expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.368.825; 6.342.216; 6.338.846; 6.261.805; 6.245.528; 6.225.060; 6.183.987; 6.168.932; 6.126.944; 6.096.304; 6.013.433; 5.965.393; 5.939.285; 5.891.676; 5.871.986; 5.861.279; 5.858.368; 5.843.733; 5.762.939; 5.753.220; 5.605.827; 5.583.023; 5.571.709; 5.516.657; 5.290.686; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082.
- 20 25 Se conocen en la técnica vectores que son útiles en los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus e incluyen, por ejemplo, vectores de transferencia y expresión en insectos derivados del baculovirus virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), que es un vector de expresión vírico independiente de auxiliar. Los vectores de expresión víricos derivados de este sistema generalmente utilizan el promotor del gen de polihedrina vírica fuerte para dirigir la expresión de genes heterólogos. Véase en general, O'Reilly y col., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).
- 30 35 Antes de insertar el gen ajeno en el genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente que comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia codificante de interés y secuencia de terminación de la transcripción, normalmente se ensamblan en una construcción de sustitución intermedia (vector de transferencia). Las construcciones de sustitución intermedias se mantienen con frecuencia en un replicón, por ejemplo, un elemento cromosómico extra (por ejemplo, plásmidos) capaz de establecer el mantenimiento en un hospedador, por ejemplo, bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un hospedador adecuado para la clonación y amplificación. Más específicamente, el plásmido puede contener la señal de poliadenilación de polihedrina (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) y un gen de resistencia a ampicilina procariota (amp) y un origen de replicación para la selección y la propagación en *E. coli*.
- 40 45 Un vector de transferencia utilizado generalmente para introducir genes ajenos en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, pVL985, que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo desde el ATT. Véase Luckow y Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Otros vectores disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).
- 50 55 60 Despues de la inserción del gen heterólogo, el vector de transferencia y el genoma de baculovirus de tipo silvestre se cotransfectan en una célula hospedadora de insecto. En la técnica, se conocen los métodos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus. Véase SUMMERS y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow y Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen como el gen de la polihedrina, por recombinación de cruce doble homólogo; la inserción también puede ser en un sitio de enzima de restricción introducido por ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11(4):91.
- 65 70 75 La transfección se puede realizar por electroporación. Véase TROTTER y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Alternativamente, se pueden utilizar liposomas para transfectar las células de insecto con el vector de expresión recombinante y el baculovirus. Véase, por ejemplo, Liebman y col., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves y col., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura y col., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570; Schmidt y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Sifert y col., NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS y col., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin y col., NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost y col., GENE (1997) 190:139; Jakobsson y col., J. BIOL. CHEM.

(1996) 271:22203; Rowles y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley y col., J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk y col., J. VIROL. (1994) 68(2):766; y Peng y col., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Los liposomas disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, Cellfectin® y Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Además, se puede utilizar transfección de fosfato de calcio. Véase TROTTER y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; y Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.

5 Los vectores de expresión de baculovirus generalmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la 10 transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que generalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de baculovirus también puede tener un segundo dominio llamado 15 potenciador que, si está presente, generalmente está distante del gen estructural. Además, la expresión puede ser regulada o constitutiva.

20 Los genes estructurales, transcritos abundantemente en momentos tardíos en el ciclo de infección, proporcionan secuencias promotoras especialmente útiles. Los ejemplos incluyen las secuencias derivadas del gen que codifica la proteína de polihedro viral (FRIESEN y col., The Regulation of Baculovirus Gene Expression en THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839 y 0 155 476) y el gen que codifica la proteína p10 (Vlak y col., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765).

25 El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta en un baculovirus recombinante infeccioso y las placas que crecen posteriormente se pueden purificar a través de las técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11(4):91; SUMMERS y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987).

30 Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para infección en varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros, *Aedes aegypti* (ATCC N.º CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC N.º CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC N.º 1963), *Spodoptera frugiperda* y 35 *Trichoplusia ni*. Véase Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell y col., J. VIROL. (1985) 56:153; Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. Véase en general, Fraser y col., IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Más específicamente, las líneas celulares utilizadas para los sistemas de vector de expresión de baculovirus incluyen generalmente, entre otros, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC N.º CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. N.º 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*) y High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (50 *Trichoplusia ni*).

40 Están disponibles en el mercado las células y los medios de cultivo para la expresión directa y de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/expresión, y en general la tecnología de cultivo celular es conocida por los expertos en la materia.

45 **E. coli, especies de Pseudomonas y otros procariotas.** Las técnicas de expresión bacteriana son conocidas por los expertos en la materia. Hay una gran diversidad de vectores disponibles para utilizar en hospedadores bacterianos. Los vectores pueden ser vectores de copia única o de una multiplicidad alta o baja de copias. Los vectores pueden servir para clonación o expresión. En vista de la extensa bibliografía con respecto a los vectores, la disponibilidad comercial de muchos vectores e incluso manuales que describen vectores y sus características y mapas de restricción, no se requiere un análisis exhaustivo en el presente documento. Como se sabe, los vectores normalmente implican marcadores que posibilitan la selección, pudiendo proporcionar los marcadores resistencia a agentes citotóxicos, prototrofia o inmunidad. Con frecuencia, hay diversos marcadores presentes que proporcionan 50 diferentes características.

55 Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que generalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado operador, que se puede solapar con un sitio de unión a ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada (inducible) negativa, ya que una proteína represora génica se puede unir al operador e inhibir así la transcripción de un gen específico. Se puede producir expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, como el operador. Además, se puede lograr una regulación positiva por una secuencia de unión a la proteína activadora génica que, si está presente, está habitualmente próxima (5') a la secuencia de unión a la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora génica es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Por lo tanto, la expresión regulada puede ser positiva o negativa y potenciar o reducir así la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras especialmente útiles. Los ejemplos incluyen las secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col., NATURE (1977) 198:1056] y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (trp) [Goeddel y col., NUC, ACIDS RES. (1980) 5:4057; Yelverton y col., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; la patente de EE.UU. N.º 4.738.921; las publicaciones de EP N.º 036 776 y 121 775]. El sistema promotor de β -galactosidasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake y col., NATURE (1981) 292:128] y T5 [patente de EE.UU. N.º 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Los métodos preferidos de la presente invención utilizan promotores fuertes, como el promotor de T7 para inducir polipéptidos de relaxina a niveles altos. Los ejemplos de estos vectores son conocidos por los expertos en la materia e incluyen la serie pET29 de Novagen y los vectores pPOP descritos en el documento WO 99/05297. Estos sistemas de expresión producen niveles altos de polipéptidos de relaxina en el hospedador sin afectar la viabilidad de la célula hospedadora o sus parámetros de crecimiento. pET19 (Novagen) es otro vector conocido en la técnica.

Además, los promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza también actúan como promotores bacterianos. Por ejemplo, se pueden unir secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago con las secuencias de los operones de otros promotores bacterianos o bacteriófagos, creando un promotor híbrido sintético [patente de EE.UU. N.º 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac comprendido por secuencias tanto del promotor trp como del operón lac regulado por el represor lac [Amann y col., GENE (1983) 25:167; de Boer y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de origen natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir niveles altos de expresión de algunos genes en procariotas. El sistema de ARN polimerasa/promotor de bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier y col., J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor y col., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar comprendido por un promotor de bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (publicación de EP N.º 267 851).

Además de una secuencia promotora operativa, un sitio de unión a ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes ajenos en procariotas. En *E. coli*, el sitio de unión a ribosoma se denomina la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio [Shine y col., NATURE (1975) 254:34]. Se cree que la secuencia SD promueve la unión de ARNm al ribosoma por el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' de ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", en Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariotas con sitios de unión a ribosoma débil [Sambrook y col. "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

El término "hospedador bacteriano" o "célula hospedadora bacteriana" se refiere a una bacteria que se puede utilizar, o se ha utilizado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. El término incluye la descendencia de la célula hospedadora bacteriana original que se ha transfectado. Se entiende que la descendencia de una sola célula parenteral puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es lo suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición.

La selección de bacterias hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos de relaxina es conocida por los expertos en la materia. Al seleccionar hospedadores bacterianos para expresión, los hospedadores adecuados pueden incluir los que se ha demostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, baja actividad proteolítica y resistencia global. Los hospedadores bacterianos están disponibles en general en diversas fuentes, incluyendo, pero no limitado a, el Centro de Estirpes Bacterianas, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA). La fermentación industrial/farmacéutica generalmente utiliza bacterias derivadas de cepas K (por ejemplo, W3110) o de bacterias derivadas de cepas B (por ejemplo, BL21). Estas cepas son particularmente útiles debido a que sus parámetros de crecimiento se conocen extremadamente bien y son resistentes. Además, estas cepas no son patógenas, lo que es importante comercialmente por razones de seguridad y ambientales. Otros ejemplos de hospedadores *E. coli* adecuados incluyen, entre otros, cepas de BL21, DH10B o derivados de las mismas. En otra realización de los métodos de la presente invención, el huésped de *E. coli* es una cepa proteasa menos que incluye, entre otros, OMP- y LON-. La cepa de célula hospedadora puede ser una especie de *Pseudomonas*, incluyendo, pero no limitado a, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Se sabe que *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, cepa MB101 designada, es útil para producción recombinante y está disponible para procesos de producción de proteínas terapéuticos. Ejemplos de un sistema de expresión de *Pseudomonas* incluyen el sistema disponible de The Dow Chemical Company como una cepa huésped (Midland, MI disponible en línea en dow.com).

Una vez que se ha establecido una cepa de célula hospedadora recombinante (es decir, la construcción de expresión se ha introducido en la célula hospedadora y se aislan células hospedadoras con la construcción de expresión apropiada), la cepa de célula hospedadora recombinante se cultiva en condiciones apropiadas para la 5 producción de polipéptidos de relaxina. Como resultará evidente para un experto en la materia, el método de cultivo de la cepa de célula hospedadora recombinante dependerá de la naturaleza de la construcción de expresión utilizada y de la identidad de la célula hospedadora. Las cepas hospedadoras recombinantes normalmente se 10 cultivan utilizando métodos que se conocen por los expertos en la materia. Las células hospedadoras recombinantes normalmente se cultivan en medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales 15 inorgánicas y, opcionalmente, que contiene vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y otros suplementos de cultivo proteínicos conocidos por los expertos en la materia. El medio líquido para cultivo de células hospedadoras puede contener opcionalmente antibióticos o antifúngicos para evitar el crecimiento de microorganismos no deseables o compuestos incluyendo, pero no limitado a, antibióticos para seleccionar células hospedadoras que contienen el vector de expresión.

Las células hospedadoras recombinantes se pueden cultivar en formatos continuos o discontinuos, con recolección 20 de células (en el caso en el que el polipéptido de relaxina se acumule de forma intracelular) o recolección de sobrenadante de cultivo en formatos continuos o discontinuos. Para producción en células hospedadoras procariotas, se prefieren cultivo discontinuo y recogida de células.

Los polipéptidos de relaxina de la presente invención normalmente se purifican después de expresión en sistemas 25 recombinantes. El polipéptido de relaxina se puede purificar a partir de células hospedadoras o medio de cultivo a través de diversos métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos de relaxina producidos en células hospedadoras bacterianas pueden ser poco solubles o insolubles (en forma de cuerpos de inclusión). En una 30 realización de la presente invención, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos fácilmente en el polipéptido de relaxina que se seleccionan para el fin de aumentar la solubilidad de la proteína producida de forma recombinante utilizando los métodos desvelados en el presente así como los conocidos en la técnica. En el caso de proteína insoluble, se puede recolectar la proteína de lisados de células hospedadoras mediante centrifugación y se pueden seguir 35 adicionalmente por homogeneización de las células. En el caso de proteína poco soluble, se pueden añadir compuestos que incluyen, entre otros, polietilenimina (PEI) para inducir la precipitación de proteína parcialmente soluble. Despues se puede recolectar la proteína precipitada convenientemente por centrifugación. Se pueden romper u homogenizar células hospedadoras recombinantes para liberar los cuerpos de inclusión desde el interior 40 de las células utilizando diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. La rotura u homogeneización de las células hospedadoras se puede realizar utilizando técnicas conocidas incluyendo, pero no limitado a, rotura enzimática de células, sometimiento a ultrasonidos, homogeneización suave o rotura de liberación a alta presión. En una realización del método de la presente invención, se utiliza la técnica de liberación a alta presión para romper las 45 células hospedadoras de *E. coli* para liberar los cuerpos de inclusión de los polipéptidos de relaxina. Cuando se manipulan cuerpos de inclusión del polipéptido de relaxina, puede ser ventajoso minimizar el tiempo de homogeneización en repeticiones para maximizar la producción de cuerpos de inclusión sin pérdida debido a factores como solubilización, cizallamiento mecánico o proteólisis.

El polipéptido de relaxina insoluble o precipitado después se puede solubilizar utilizando cualquiera de varios 50 agentes de solubilización adecuados conocidos en la técnica. El polipéptido de relaxina se puede solubilizar con urea o clorhidrato de guanidina. El volumen del polipéptido de relaxina solubilizado debería minimizarse de modo que puedan producirse lotes grandes utilizando tamaños de lotes convenientemente manejables. Este factor puede ser significativo en una situación comercial a gran escala en la que el hospedador recombinante se puede cultivar en lotes que son de miles por litros de volumen. Además, cuando se prepara polipéptido de relaxina en una situación 55 comercial a gran escala, en particular para usos farmacéuticos humanos, se debería evitar el uso de compuestos químicos fuertes que puedan dañar la maquinaria y el recipiente o el producto proteico en sí mismo, si es posible. Se ha mostrado en el método de la presente invención que el agente desnaturalizante más suave urea se puede utilizar para solubilizar los cuerpos de inclusión del polipéptido de relaxina en lugar del agente desnaturalizante más fuerte clorhidrato de guanidina. El uso de urea reduce significativamente el riesgo de daño al equipamiento de acero inoxidable utilizado en el proceso de fabricación y purificación del polipéptido de relaxina mientras que solubiliza eficazmente los cuerpos de inclusión del polipéptido de relaxina.

En el caso de proteína de relaxina soluble, la relaxina se puede secretar en el espacio periplásmico o en el medio de 60 cultivo. Además, la relaxina soluble puede estar presente en el citoplasma de las células hospedadoras. Puede ser deseable concentrar relaxina soluble antes de realizar las etapas de purificación. Se pueden utilizar las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para concentrar relaxina soluble a partir de, por ejemplo, lisados celulares o medio de cultivo. Además, se pueden utilizar las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para romper células hospedadoras y liberar relaxina soluble del citoplasma o espacio periplásmico de las células hospedadoras.

Cuando se produce el polipéptido de relaxina como una proteína de fusión, se puede retirar la secuencia de fusión. 65 Se puede lograr la supresión de una secuencia de fusión por escisión enzimática o química. La supresión enzimática de secuencias de fusión se puede lograr utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. La selección

de enzima para la supresión de la secuencia de fusión se determinará mediante la identidad de la fusión y las condiciones de reacción se especificarán mediante la secreción de enzima como resultará evidente para un experto en la materia. La escisión química se puede lograr utilizando reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitado a, bromuro de cianógeno, TEV proteasa y otros reactivos. El polipéptido de relaxina escindido se puede purificar a partir de la secuencia de fusión escindida a través de métodos conocidos por los expertos en la materia. Los métodos se determinarán por la identidad y las propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido de relaxina, como resultará evidente para un entendido en la materia. Los métodos para la purificación pueden incluir, entre otros, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico o diálsis o cualquier combinación de estos.

El polipéptido de relaxina también se puede purificar para retirar ADN de la solución de proteína. Se puede retirar ADN a través de cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo precipitación o cromatografía de intercambio iónico, pero se puede retirar por precipitación con un agente precipitante de ácido nucleico, tales como, por ejemplo, sulfato de protamina. El polipéptido de relaxina se puede separar del ADN precipitado utilizando métodos conocidos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugación o filtración. La supresión de moléculas de ácido nucleico del huésped es un factor importante en una situación en la que el polipéptido de relaxina se va a utilizar para tratar seres humanos y los métodos de la presente invención reducen el ADN de la célula hospedadora a niveles farmacéuticamente aceptables.

También se pueden utilizar métodos para la fermentación a pequeña escala o a gran escala en expresión proteica, incluyendo, pero no limitado a, fermentadores, matraces de agitación, biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, sistemas de cultivos de frascos rotatorios y sistemas de biorreactores de tanque con agitación. Cada uno de estos métodos se puede realizar en un proceso de modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

En general se pueden recuperar polipéptidos de relaxina humanos de la invención utilizando métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, se puede centrifugar o filtrar medio de cultivo o lisado celular para retirar restos celulares. El sobrenadante se puede concentrar o diluir a un volumen deseado o diafiltrarse en un tampón adecuado para acondicionar la preparación para purificación adicional. La purificación adicional del polipéptido de relaxina de la presente invención incluye separar formas desanidadas y cortadas de la variante del polipéptido de relaxina de la forma intacta.

Cualquiera de los siguientes métodos a modo de ejemplo se puede emplear para la purificación de polipéptidos de relaxina de la invención: cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (utilizando, incluyendo, pero no limitado a, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés); HPLC de fase inversa; filtración en gel (utilizando, incluyendo, pero no limitado a, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de quelato metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procesos electroforéticos (incluyendo, pero no limitado a, centrado isoelectrónico preparatorio), solubilidad diferencial (incluyendo, pero no limitado a, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

Las proteínas de la presente invención, incluyendo, pero no limitado a, proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, péptidos que comprenden aminoácidos no naturales, anticuerpos para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, compañeros de unión para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, etc., se pueden purificar, parcial o sustancialmente hasta homogeneidad, de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos y utilizados por los expertos en la materia. En consecuencia, se pueden recuperar polipéptidos de la invención y purificar a través de cualquiera de varios métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitado a, precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido o base, cromatografía en columna, cromatografía en columna de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía del fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, electroforesis en gel y similares. Se pueden utilizar etapas de replegamiento de proteínas, según se deseé, al preparar proteínas maduras correctamente plegadas. Se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de afinidad u otros métodos adecuados en etapas de purificación final en las que se desea alta pureza. En una realización, se utilizan anticuerpos preparados contra aminoácidos no naturales (o proteínas o péptidos que comprenden aminoácidos no naturales) como reactivos de purificación, incluyendo, pero no limitado a, purificación basada en afinidad de proteínas o péptidos que comprenden uno o más aminoácido o aminoácidos no naturales. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se deseé, los polipéptidos se usan opcionalmente para diversas utilidades, incluyendo, pero no limitado a, como componentes de ensayo, agentes terapéuticos, profilaxis, diagnóstico, reactivos de investigación y/o como inmunógenos para producción de anticuerpos. Se pueden obtener anticuerpos generados contra polipéptidos de la presente invención administrando los polipéptidos o fragmentos que portan epítopos o células a un animal, preferentemente a un animal no humano, usando protocolos rutinarios. Un experto en la materia podría generar anticuerpos utilizando diversas técnicas conocidas. Además, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos anteriormente descritos se pueden emplear para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos. También se pueden emplear

anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención para tratar enfermedades.

También se pueden utilizar polipéptidos de la presente invención y polinucleótidos descritos en el presente como vacunas. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir respuesta inmune de linfocitos T y/o anticuerpos, incluso, por ejemplo, linfocitos T que producen citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger al animal de enfermedad, si la enfermedad ya está establecida dentro del individuo o no. También se puede inducir una respuesta inmunológica en un mamífero a través de un método que comprende suministrar un polipéptido de la presente invención mediante un vector que dirige la expresión del polinucleótido y codificar el polipéptido *in vivo* para inducir una respuesta inmunológica tal para producir anticuerpo para proteger al animal de enfermedades de la invención. Una forma de administrar al vector es acelerándolo en las células deseadas como un recubrimiento en partículas o de otro modo. Tal vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, un ácido nucleico modificado o un híbrido de ADN/ARN. Para su uso como una vacuna, se proporcionará normalmente un polipéptido o un vector de ácido nucleico como una formulación de vacuna (composición). La formulación puede comprender adicionalmente un vehículo adecuado. Debido a que un polipéptido se puede descomponer en el estómago, éste se puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación que se conocen por los expertos en la materia. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y se puede determinar fácilmente por experimentación rutinaria.

25 *Expresión en sistemas alternativos*

Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células hospedadoras no recombinantes, células hospedadoras mutagenizadas o en sistemas sin células. Estos sistemas son adecuados para su uso en la preparación de polipéptidos de relaxina de la presente invención. La derivatización de aminoácidos con cadenas laterales reactivas, por ejemplo Lys, Cys y Tyr dio como resultado la conversión de lisina a N²-acetil-lisina. La síntesis química también proporciona un método sencillo para incorporar aminoácidos no naturales. Con el reciente desarrollo de ligamiento enzimático y ligamiento químico nativo de fragmentos peptídicos, es posible preparar proteínas más grandes. Véase, por ejemplo, P. E. Dawson y S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000). El ligamiento peptídico químico y ligamiento químico nativo se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.184.344, publicación de la patente de EE.UU. N.º 2004/0138412, publicación de la patente de EE.UU. N.º 2003/0208046, WO 02/098902 y WO 03/042235. Se ha utilizado un método biosintético general *in vitro* en el que un ARNt supresor químicamente acilado con el aminoácido no natural deseado se añade a un extracto *in vitro* que puede soportar la biosíntesis de proteínas, para incorporar en sitios específicos más de 100 aminoácidos no naturales en varias proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véase, por ejemplo, V. W. Cornish, D. Mendel y P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, *Science* 244:182-188 (1989); y, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, *Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013-8014 (1989). Se ha introducido una amplia serie de grupos funcionales en proteínas para estudios de estabilidad proteica, plegamiento proteico, mecanismo enzimático y transducción de señal.

Además de las referencias observadas en el presente documento, varios métodos de plegamiento de proteínas/purificación se conocen por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitado a, los que se presentan en R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag y col. (1996) *Protein Methods*, 2^a edición Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Hams y Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3rd edition Springer Verlag, NY; Janson y Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998), *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ; y las referencias citadas allí.

Una ventaja de producir una proteína o polipéptido de interés con un aminoácido no natural en una célula hospedadora eucariota o célula hospedadora no eucariota es que normalmente las proteínas o polipéptidos se plegarán en sus conformaciones nativas. Sin embargo, en determinadas realizaciones de la invención, los expertos en la materia reconocerán que, después de la síntesis, la expresión y/o purificación, las proteínas o péptidos pueden poseer una conformación diferente de las conformaciones deseadas de los polipéptidos relevantes. En un aspecto de la invención, la proteína o polipéptido expresado opcionalmente se desnaturaliza y después se re-naturaliza. Esto se consigue utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, añadiendo una chaperonina a la proteína o polipéptido de interés, solubilizando las proteínas en un agente caotrópico, por ejemplo guanidina

HCl, utilizando proteínas disulfuro isomerasa, etc.

En general, es ocasionalmente deseable desnaturalizar y reducir polipéptidos expresados y después provocar que los polipéptidos se vuelvan a plegar en la conformación preferida. Por ejemplo, se puede añadir guanidina, urea, 5 DTT, DTE o una chaperonina a un producto de traducción de interés. Los métodos para reducir, desnaturalizar y renaturalizar proteínas son conocidos por los expertos en la materia (véase, las referencias anteriores, y Debinski, y col. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; y Buchner, y col., (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270). Debinski, y col., por ejemplo, describen la desnaturalización y reducción 10 de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. Las proteínas pueden volver a plegarse en un tampón redox que contiene, incluyendo, pero no limitado a, glutatión oxidado y L-arginina. Los reactivos de replegamiento se pueden hacer fluir o mover de otro modo hasta entrar en contacto con el o los polipéptidos u otro producto de expresión o viceversa.

15 En el caso de producción procariota de polipéptido de relaxina, el polipéptido de relaxina producido de este modo se puede plegar erróneamente y por lo tanto tiene actividad biológica reducida o carece de ella. La bioactividad de la proteína se puede restaurar mediante "replegamiento". En general, el polipéptido de relaxina plegado erróneamente se vuelve a plegar solubilizando (cuando el polipéptido de relaxina también es insoluble), desplegando y reduciendo la cadena de polipéptidos utilizando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (por ejemplo, urea o guanidina) y un agente reductor que pueden reducir enlaces disulfuro (por ejemplo ditiotreitol, DTT o 2-mercaptopetanol, 2-ME). A 20 una concentración moderada de caótropo, después se le añade un agente oxidante (por ejemplo, oxígeno, cistina o cistamina), que permite la reformación de enlaces disulfuro. El polipéptido de relaxina se puede replegar utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 4.511.502, 4.511.503 y 4.512.922. El polipéptido de relaxina también se puede coplegar con otras proteínas para 25 formar heterodímeros o heteromultímeros.

25 Después del replegamiento, la relaxina se puede purificar adicionalmente. La purificación de relaxina se puede conseguir utilizando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, cromatografía de afinidad y similares o cualquier combinación de las 30 mismas. La purificación adicional también puede incluir una etapa de secado o precipitación de la proteína purificada.

35 Después de la purificación, la relaxina se puede intercambiar en diferentes tampones y/o concentrar por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, diafiltración y diálsis. La relaxina que se proporciona como una proteína purificada sencilla se puede someter a agregación y precipitación.

40 La relaxina purificada puede ser al menos el 90 % pura (según se mide por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, RP-HPLC o electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico, SDS-PAGE), al menos el 95 % pura, al menos el 98 % pura o al menos el 99 % o más pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza de la relaxina, la relaxina es suficientemente pura para su uso como producto farmacéutico o para procesamiento adicional, por ejemplo conjugación con un polímero soluble en agua tal como PEG.

45 Determinadas moléculas de relaxina se pueden utilizar como agentes terapéuticos en ausencia de otros ingredientes activos o proteínas (distintos de excipientes, vehículos y estabilizadores, albúmina sérica y similares) o pueden formar complejo con otra proteína o un polímero.

50 **Métodos de purificación generales.** Se pueden realizar cualquiera de varias etapas de aislamiento en el lisado celular, extracto, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células hospedadoras, citoplasma de las células hospedadoras u otro material, que comprende polipéptido de relaxina o en cualquiera de las mezclas de polipéptidos de relaxina resultantes de cualquier etapa de aislamiento incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés), adsorción de lecho expandido o cualquier combinación o repetición de las mismas y en cualquier orden adecuado.

55 55 Los equipos y otros materiales necesarios utilizados en la realización de las técnicas descritas en el presente documento están disponibles en el mercado. Bombas, colectores de fracciones, monitores, grabadoras y sistemas completos están disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway NJ). Los materiales cromatográficos incluyendo, pero no limitado a, materiales de matriz de intercambio, medios y tampones también están disponibles por las compañías.

60 65 El equilibrado y otras etapas en los procesos de cromatografía en columna descritos en el presente documento tales como lavado y elución, se pueden lograr más rápidamente utilizando equipos especializados tales como una bomba. Las bombas disponibles en el mercado incluyen, entre otros, Bomba P-50 HILOAD®, Bomba Peristáltica P-1, Bomba P-901 y Bomba P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Algunos ejemplos de colectores de fracciones incluyen colector de fracciones RediFrac, colector de fracciones FRAC-100 y FRAC-200 y colector de fracciones SUPERFRAC® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). También están disponibles mezcladores para formar gradientes de concentración lineales y de pH. Los mezcladores disponibles en el mercado incluyen mezclador de Gradiente GM-1 y mezcladores En-Línea (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

El proceso cromatográfico se puede controlar utilizando cualquier monitor disponible en el mercado. Tales monitores se pueden utilizar para reunir información como UV, pH y conductividad. Ejemplos de detectores incluyen monitor UV-1, UVICORD® S II, monitor UV- M II, monitor UV-900, monitor UPC-900, monitor pH/C-900 y monitor de conductividad (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). De hecho, los sistemas completos que incluyen los diversos sistemas AKTA® de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) están disponibles en el mercado.

En una realización de la presente invención, por ejemplo, el polipéptido de relaxina se puede reducir y desnaturalizar primero desnaturalizando el polipéptido de relaxina purificado resultante en urea, seguido de la dilución en tampón TRIS que contiene un agente reductor (por ejemplo DTT) a un pH adecuado. En otra realización, el polipéptido de relaxina se desnaturaliza en urea en un intervalo de concentración de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 9 M, seguido de la dilución en tampón TRIS a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0. La mezcla de replegamiento de esta realización después se puede incubar. En una realización, la mezcla de replegamiento se incuba a temperatura ambiente de cuatro a veinticuatro horas. La mezcla de polipéptido de relaxina reducida y desnaturalizada después se puede aislar o purificar adicionalmente.

Como se indica en el presente documento, el pH de la primera mezcla de polipéptido de relaxina se puede ajustar antes de realizar cualquier etapa de aislamiento posterior. Además, la primera mezcla de polipéptido de relaxina o cualquier mezcla posterior del mismo se puede concentrar utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por otra parte, el tampón de elución que comprende la primera mezcla de polipéptido de relaxina o cualquier mezcla posterior del mismo se puede intercambiar por un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Cromatografía de intercambio iónico. En una realización y como una etapa adicional opcional, se puede realizar cromatografía de intercambio iónico en la primera mezcla de polipéptido de relaxina. Véase generalmente ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. N.º 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Las columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado incluyen columnas HITRAP®, HIPREP®, y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tales columnas utilizan intercambiadores aniónicos fuertes, por ejemplo Q SEFAROSA® de flujo rápido, Q SEFAROSA® de alto rendimiento y Q SEFAROSA® XL; intercambiadores catiónicos fuertes, por ejemplo SP SEFAROSA® de alto rendimiento, SP SEFAROSA® de flujo rápido y SP SEFAROSA® XL; intercambiadores aniónicos débiles, por ejemplo DEAE SEFAROSA® de flujo rápido; e intercambiadores catiónicos débiles, por ejemplo CM SEFAROSA® de flujo rápido (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se puede realizar cromatografía en columna de intercambio aniónico o catiónico en el polipéptido de relaxina en cualquier etapa del proceso de purificación para aislar el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado. La etapa de cromatografía de intercambio catiónico se puede realizar utilizando cualquier matriz de intercambio catiónico adecuada. Las matrices de intercambio catiónico útiles incluyen, entre otros, materiales de matriz de intercambio catiónico fibrosas, porosas, no porosas, microgranulares, en perlas o reticuladas. Los materiales de matriz de intercambio catiónico incluyen, entre otros, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice, poliéster o compuestos de cualquiera de los anteriores.

La matriz de intercambio catiónico puede ser cualquier intercambiador catiónico adecuado, incluyendo intercambiadores catiónicos fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes pueden permanecer ionizados durante un amplio intervalo de pH y, por lo tanto, pueden ser capaces de unirse a relaxina durante un intervalo de pH amplio. Los intercambiadores catiónicos débiles, sin embargo, pueden perder ionización en función del pH. Por ejemplo, un intercambiador catiónico débil puede perder carga cuando el pH baja por debajo de aproximadamente pH 4 o pH 5. Los intercambiadores catiónicos fuertes adecuados incluyen, entre otros, grupos funcionales cargados, por ejemplo sulfopropilo (SP), metil sulfonato (S) o sulfóetilo (SE). La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión con relaxina de aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,0. Alternativamente, el intercambiador catiónico fuerte puede tener un intervalo de pH de unión con relaxina de aproximadamente pH 2,5 y aproximadamente pH 5,5. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte que tiene un pH de unión con relaxina de aproximadamente 3,0. Alternativamente, la matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión a relaxina de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. La matriz de intercambio catiónico puede ser un intercambiador catiónico fuerte, preferentemente que tiene un intervalo de pH de unión con relaxina de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12,5. Alternativamente, el intercambiador catiónico fuerte puede tener un intervalo de pH de unión con relaxina de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 12,0.

Antes de cargar la relaxina, la matriz de intercambio catiónico se puede equilibrar, por ejemplo, utilizando varios volúmenes de columna de un ácido débil diluido, por ejemplo, cuatro volúmenes de columna de 20 mM ácido acético, pH 3. Después del equilibrio, se puede añadir la relaxina y la columna se puede lavar de una a varias veces,

antes de la elución de relaxina sustancialmente purificada, utilizando también una solución de ácido débil, por ejemplo una solución de ácido acético o ácido fosfórico débil. Por ejemplo, se pueden utilizar aproximadamente de 2 a 4 volúmenes de columna de 20 mM ácido acético, pH 3, para lavar la columna. También se pueden utilizar lavados adicionales, por ejemplo, utilizando 2-4 volúmenes de columna de 0,05 M acetato sódico, pH 5,5 o 0,05 M acetato

5 sódico mezclado con 0,1 M cloruro sódico, pH 5,5. Alternativamente, utilizando métodos conocidos en la técnica, la matriz de intercambio catiónico se puede equilibrar utilizando varios volúmenes de columna de una base débil diluida.

10 Alternativamente, la relaxina sustancialmente purificada se puede eluir poniendo en contacto la matriz de intercambio catiónico con un tampón que tiene un pH o fuerza iónica suficientemente bajos para desplazar la relaxina de la matriz. El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 15 6,0. Más específicamente, el pH del tampón de elución puede variar de entre aproximadamente pH 2,5 y aproximadamente pH 5,5, entre aproximadamente pH 2,5 y aproximadamente pH 5,0. El tampón de elución puede tener un pH de aproximadamente 3,0. Además, la cantidad de tampón de elución puede variar ampliamente y generalmente estará en el intervalo de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 volúmenes de columna.

20 Después de la adsorción del polipéptido de relaxina en la matriz de intercambio catiónico, se puede eluir el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado poniendo en contacto la matriz con un tampón que tenga un pH o fuerza iónica suficientemente altos para desplazar el polipéptido de relaxina de la matriz. Los tampones adecuados para su uso en elución a pH alto del polipéptido de relaxina sustancialmente purificado pueden incluir, entre otros, tampones de citrato, fosfato, formato, acetato, HEPES y MES que varían en concentración de al menos 25 aproximadamente 5 mM a al menos aproximadamente 100 mM.

30 **Cromatografía de fase inversa.** Se puede realizar RP-HPLC para purificar proteínas siguiendo protocolos adecuados que se conocen por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pearson y col., ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier y col., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani y col., J. CHROM. (1986) 359:391-402. Se puede realizar RP-HPLC en el polipéptido de relaxina para aislar el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado. A este respecto, se pueden utilizar resinas derivatizadas con sílice con funcionalidades de alquilo con varias longitudes, incluyendo, pero no limitado a, al menos aproximadamente C3, a al menos 35 aproximadamente C30, al menos aproximadamente C3 a al menos aproximadamente C20 o al menos aproximadamente C3 a al menos aproximadamente C18. Alternativamente, se puede usar una resina polimérica. Por ejemplo, se puede utilizar resina TosoHaas Amberchrome CG1000sd, que es una resina de polímero de estireno. También se pueden utilizar resinas de polímeros o de ciano con diversas longitudes de cadena de alquilo. Además, la columna de RP-HPLC se puede lavar con un disolvente, por ejemplo etanol. La columna Source RP es otro ejemplo de una columna de RP-HPLC.

40 Se puede utilizar un tampón de elución adecuado que contenga un agente de emparejamiento de iones y un modificador orgánico, por ejemplo metanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo o etanol, para eluir el polipéptido de relaxina de la columna de RP-HPLC. Los agentes de emparejamiento de iones más comúnmente utilizados incluyen, entre otros, ácido acético, ácido fórmico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido heptafluorobutírico, trietilamina, tetrametilamonio, tetrabutilamonio y acetato de trietilamonio. La elución se puede realizar utilizando uno o más gradientes o condiciones isocráticas, con condiciones de gradiente preferidas para reducir el tiempo de separación y disminuir la anchura de los picos. Otro método implica el uso de dos gradientes con diferentes intervalos de concentración de disolvente. Ejemplos de tampones de elución adecuados para su uso en el presente pueden incluir, entre otros, soluciones de acetato de amonio y acetonitrilo.

Técnicas de purificación de cromatografía de interacción hidrófoba

50 Se puede realizar cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) en el polipéptido de relaxina. Véase generalmente HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. N.º 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Las matrices de HIC adecuadas pueden incluir, entre otras, matrices alquilo o arilo sustituidas, por ejemplo matrices butil, hexil, octil o fenil sustituidas, incluyendo matrices de agarosa, agarosa reticulada, sefarosa, celulosa, sílice, dextrano, poliestireno, poli(metacrilato) y resinas de modo mixto, incluyendo, pero no limitado a, una resina de polietilenamina o una matriz 55 de poli(metacrilato) butil o fenilo sustituida. Las fuentes disponibles en el mercado para cromatografía en columna de interacción hidrófoba incluyen, entre otros, columnas HITRAP®, HIPREP® y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

60 En resumen, antes de la carga, la columna de HIC se puede equilibrar utilizando tampones convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo solución de ácido acético/cloruro sódico o HEPES que contiene sulfato de amonio. Se puede utilizar sulfato de amonio como el tampón para cargar la columna de HIC. Despues de cargar el polipéptido de relaxina, despues se puede lavar la columna utilizando tampones y condiciones convencionales para retirar los materiales no deseados pero conservando el polipéptido de relaxina en la columna de HIC. El polipéptido de relaxina se puede eluir con de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 volúmenes de columna de un tampón convencional, por ejemplo un tampón HEPES que contiene EDTA y concentración de sulfato 65 de amonio más baja que el tampón de equilibrio o un tampón de ácido acético/cloruro sódico, entre otros. También

se puede utilizar un gradiente salino lineal decreciente, por ejemplo, que utiliza un gradiente de fosfato potásico, para eluir las moléculas de relaxina. El eluyente después se puede concentrar, por ejemplo, mediante la filtración, por ejemplo diafiltración o ultrafiltración. Se puede utilizar diafiltración para retirar la sal utilizada para eluir el polipéptido de relaxina.

5 **Otras técnicas de purificación.** Se puede realizar otra etapa de aislamiento, utilizando, por ejemplo, filtración en gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (N.º de Cat. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), cromatografía de hidroxiapatita (las matrices adecuadas incluyen, entre otros, HA-Ultrogel, alta resolución (Calbiochem), hidroxiapatita cerámica CHT (BioRad), hidroxiapatita Bio-Gel HTP (BioRad)), HPLC, 10 adsorción de lecho expandido, ultrafiltración, diafiltración, liofilización y similares, en la primera mezcla de polipéptido de relaxina o cualquier mezcla posterior del mismo, para retirar cualquier exceso de sales y para reemplazar el tampón con un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento o incluso formulación del producto farmacológico final.

15 El rendimiento de polipéptido de relaxina, incluyendo el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado, se puede controlar en cada etapa descrita en el presente documento utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Las técnicas también se pueden utilizar para evaluar el rendimiento del polipéptido de relaxina sustancialmente purificado después de la última etapa de aislamiento. Por ejemplo, el rendimiento del polipéptido de relaxina se puede controlar utilizando cualquiera de varias columnas de cromatografía líquida de alta presión de fase 20 inversa, que tienen diversas longitudes de cadena de alquilo, por ejemplo ciano RP-HPLC, C18RP-HPLC, así como HPLC de intercambio catiónico y HPLC de filtración en gel.

25 En realizaciones específicas de la presente invención, el rendimiento de la relaxina después de cada etapa de purificación puede ser de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos 30 aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, al menos aproximadamente el 99,9 % o al menos aproximadamente el 99,99 % de la relaxina en el material de partida para cada etapa de purificación.

35 La pureza se puede determinar utilizando técnicas convencionales, por ejemplo SDS-PAGE o midiendo el polipéptido de relaxina utilizando ensayos de Western blot y ELISA. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos policlonales contra proteínas aisladas de la fermentación de levadura de control negativo y la recuperación de intercambio catiónico. Los anticuerpos también se pueden utilizar para explorar con respecto a la presencia de 40 proteínas de célula hospedadora contaminantes.

45 El material de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, cuyas superficies portan cadenas de alquilo C4. La separación del polipéptido de relaxina de las impurezas proteínicas se basa en las diferencias en la fuerza de las interacciones hidrófobas. Se realiza elución con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Se realiza HPLC preparatoria utilizando una columna de acero inoxidable (cargada de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluato de hidroxiapatita Ultrogel se acidifica añadiendo ácido trifluoroacético y se carga en la columna de Vydac C4. Para el lavado y la elución se utiliza un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Las fracciones se recogen y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato. Las fracciones del polipéptido de relaxina que están dentro de los límites de IPC se agrupan.

50 El material de DEAE Sefarosa (Pharmacia) consiste en grupos de dietilaminoetilo (DEAE) que se unen mediante enlace covalente a la superficie de perlas de Sefarosa. La unión del polipéptido de relaxina con los grupos DEAE se media mediante interacciones iónicas. El acetonitrilo y ácido trifluoroacético pasan a través de la columna sin retenerte. Despues de que estas sustancias se hayan retirado por lavado, se retiran las impurezas traza lavando la columna con tampón de acetato a un pH bajo. Despues la columna se lava con tampón fosfato neutro y se eluye el polipéptido de relaxina con un tampón con fuerza iónica aumentada. La columna se empaqueta con DEAE Sefarosa de flujo rápido. El volumen de columna se ajusta para asegurar una carga del polipéptido de relaxina en el intervalo 55 de 3-10 mg de polipéptido de relaxina/ml de gel. La columna se lava con agua y tampón de equilibrio (fosfato sódico/potásico). Las fracciones agrupadas del eluato de HPLC se cargan y la columna se lava con tampón de equilibrio. Despues la columna se lava con tampón de lavado (tampón de acetato sódico) seguido del lavado con tampón de equilibrio. Posteriormente, el polipéptido de relaxina se eluye de la columna con tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recoge en una porción sencilla de acuerdo con el perfil de elución maestro. El eluato de la columna de DEAE Sefarosa se ajusta a la conductividad especificada. La sustancia farmacológica resultante se esteriliza por filtración en frascos de Teflón y se almacena a -70 °C.

60 Los métodos adicionales que se pueden emplear incluyen, entre otros, etapas para retirar endotoxinas. Las endotoxinas son lipopoli-sacáridos (LPS) que se ubican en la membrana exterior de células hospedadoras Gram negativas, por ejemplo, *Escherichia coli*. El experto en la materia conoce los métodos para reducir los niveles de endotoxinas que incluyen, pero no se limitan a, técnicas de purificación que utilizan soportes de sílice, polvo de vidrio

- o hidroxiapatita, cromatografía de fase inversa, de afinidad, de exclusión por tamaño, de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una combinación de estos procesos y similares. Se pueden necesitar modificaciones o métodos adicionales para retirar contaminantes, por ejemplo proteínas que migran conjuntamente del polipéptido de interés. Se conocen por el experto en la materia los métodos para medir los niveles de 5 endotoxinas e incluyen, entre otros, ensayos de Lisado de Amebocito de *Limulus* (LAL). El ensayo Endosafe™-PTS es un sistema colorimétrico, de tubo único que utiliza cartuchos precargados con reactivo LAL, sustrato cromogénico y endotoxina convencional de control junto con un espectrofotómetro portátil. Los métodos alternativos incluyen, entre otros, un método Kinetic LAL que es turbidimétrico y utiliza un formato de 96 pocillos.
- 10 Se pueden utilizar diversos métodos y procesos para evaluar el rendimiento y la pureza de una proteína de relaxina que comprende uno o más aminoácidos codificados de modo no natural, incluyendo, pero no limitado a, el ensayo de Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE teñido con plata, SDS-PAGE teñido con coomassie, espectrometría de masas (incluyendo, pero no limitado a, MALDI-TOF) y otros métodos para caracterizar proteínas conocidos por el experto 15 en la materia.
- 15 Los métodos adicionales incluyen, entre otros: SDS-PAGE acoplado con métodos de tinción de proteínas, inmunotransferencia, desorción/ionización por láser asistido por matriz-espectrometría de masas (MALDI-MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas, centrado isoelectrónico, intercambio aniónico analítico, cromatocentrado y dicroísmo circular.
- 20 Se desarrolló un método *in vivo*, denominado incorporación por presión selectiva, para aprovechar la promiscuidad de sintetasas naturales. Véase, por ejemplo, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder y R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Una cepa auxótrofa, en la que la ruta metabólica relevante que provee a la célula un aminoácido natural particular se interrumpe, se cultiva en medio mínimo que contiene concentraciones limitadas 25 del aminoácido natural, mientras que se reprime la transcripción del gen diana. Al comienzo de una fase de crecimiento estacionaria, se agota el aminoácido natural y se reemplaza con el análogo de aminoácido no natural. La inducción de expresión de la proteína recombinante da como resultado la acumulación de una proteína que contiene el análogo no natural. Por ejemplo, utilizando esta estrategia, se han incorporado o, m y p-fluorofenilalaninas en proteínas y muestran dos picos característicos en el espectro de UV que pueden identificarse 30 fácilmente, véase, por ejemplo, C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); se ha utilizado trifluorometionina para reemplazar metionina en la lisozima del bacteriófago T4 para estudiar su interacción con ligandos quitoooligosacáridos por RMN de ¹⁹F, véase, por ejemplo, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); y se ha incorporado trifluoroleucina en lugar de leucina, dando como resultado aumento de la estabilidad térmica y química de una proteína de cremallera de leucina Véase, por ejemplo, Y. Tang, 35 G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nalcajima, W. F. DeGrado y D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Además, se incorporan selenometionina y telurometionina en diversas proteínas recombinantes para facilitar la solución de fases en cristalográfia de rayos X. Véase, por ejemplo, W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda y M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann y R. Huber, 40 *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); y N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder y R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). También se han incorporado de forma eficaz análogos de metionina con funcionalidades de alqueno o alquino, posibilitando la modificación adicional de proteínas por medios químicos. Véase, por ejemplo, J. C. van Hest y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:1282 (2000); y, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); patente de EE.UU. N.º 6.586.207; publicación de patente de EE.UU. 2002/0042097.
- 45 El éxito de este método depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por aminoacil-ARNt sintetasas que, en general, requieren alta selectividad para asegurar la fidelidad de la traducción de proteínas. Un modo de expandir el alcance de este método es relajar la especificidad de sustrato de las aminoacil-ARNt sintetasas, que se ha conseguido en un número limitado de casos. Por ejemplo, el reemplazo de Ala²⁹⁴ por Gly en 50 feniloalanil-ARNt sintetasa de *Escherichia coli* (PheRS) aumenta el tamaño del bolsillo de unión a sustrato y da como resultado la acilación de ARNtPhe por p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe) Véase, M. Tbba, P. Kast y H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). Una cepa de *Escherichia coli* que alberga esta PheRS mutante permite la incorporación de p-Cl-fenilalanina o p-Br-fenilalanina en lugar de fenilalanina. Véase, por ejemplo, M. Ibba y H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); y N. Sharma, R. Furter, P. Kast y D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). De forma similar, se mostró que una mutación puntual Phe130Ser cerca del sitio de unión de aminoácidos de tirofíl-ARNt sintetasa de *Escherichia coli* permitía que se incorporara azatirosina de forma más eficaz que tirosina. Véase, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil y S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*, 275:40324 (2000).
- 60 Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas *in vivo* es modificar sintetasas que tienen mecanismos de corrección. Estas sintetasas no pueden diferenciar y por lo tanto activar aminoácidos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales afines. Este error se corrige en un sitio separado, que desacila el aminoácido cargado de forma incorrecta del ARNt para mantener la fidelidad de la traducción de la proteína. Si la actividad de corrección de la sintetasa se deshabilita, los análogos estructurales que están activados de forma errónea pueden escapar a la función de edición e incorporarse. Este enfoque se ha demostrado 65 recientemente con la valil-ARNt sintetasa (ValRS). Véase, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V.

- de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P. Marliere, *Science*. 292:501 (2001). ValRS puede aminoacilar incorrectamente ARNtVal con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no afines se hidrolizan posteriormente por el dominio de edición. Después de mutagénesis aleatoria del cromosoma de *Escherichia coli*, se seleccionó una cepa mutante de *Escherichia coli* que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Esta ValRS defectuosa para edición carga incorrectamente ARNtVal con Cys. Debido a que Abu se asemeja de forma estérica a Cys (el grupo –SH de Cys se reemplaza con –CH3 en Abu), la ValRS mutante también incorpora Abu en proteínas cuando esta cepa mutante de *Escherichia coli* se cultiva en presencia de Abu. El análisis espectrométrico de masas muestra que aproximadamente el 24 % de las valinas se reemplazan por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.
- 5 Los métodos de síntesis de fase sólida y semisintéticos también han posibilitado la síntesis de varias proteínas que contienen nuevos aminoácidos. Por ejemplo, véase las siguientes publicaciones y las referencias citadas en las mismas, que son de la siguiente manera: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*. 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment. *J. Am Chem.* 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, *Acc Chem Res.* 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, *J Am Chem Soc.* 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S. B. H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*. 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, *CRC Crit Rev Biochem.* 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? *Protein Eng.* 1(3): 151-157 (1987); y Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C. Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, *Science*. 266(5183):243(1994).
- 10 Se ha utilizado la modificación química para introducir diversas cadenas laterales no naturales, incluso cofactores, marcadores de espín y oligonucléótidos en proteínas *in vitro*. Véase, por ejemplo, Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, *Science*. 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, *Annu Rev Biochem.* 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*. 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A., Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem.* 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L, et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc.* 88:3153-3154 (1966); y Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*. 242(4881):1038-1040 (1988).
- 15 Alternativamente, se han usado métodos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt modificados químicamente para incorporar varias sondas biofísicas en proteínas sintetizadas *in vitro*. Véase las siguientes publicaciones y las referencias citadas en las mismas: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem.* 62:483-514 (1993); y, Krieg, U.C., Walter, P., Johnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83(22):8604-8608 (1986).
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Previamente, se ha demostrado que los aminoácidos no naturales se pueden incorporar en sitios específicos en proteínas *in vitro* mediante la adición de ARNt supresor aminoacilado químicamente para reacciones de síntesis proteica programadas con un gen que contiene una mutación sin sentido ámbar deseada. Utilizando estos enfoques, se pueden sustituir varios de los veinte aminoácidos comunes con homólogos estructurales cercanos, por ejemplo, fenilalanina con fluorofenilalanina, utilizando cepas auxotrópicas para un aminoácido particular. Véase, por ejemplo, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, y col., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc.* 111:8013-8014 (1989); N. Budisa y col., *FASEB J.* 13:41-51(1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); y, Mendel, D., Comish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).
- Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de parada UAG y se aminoaciló químicamente con un aminoácido no natural. Se utilizó mutagénesis dirigida convencional para introducir el codón de parada TAG, en el sitio de interés, en el gen de la proteína. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis, *Nucleic Acids Res.* 16(3):791-802 (1988). Cuando el ARNt supresor acilado y el gen mutante se combinaron en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, el aminoácido no natural se incorporó en respuesta al codón UAG que proporcionó una proteína que contenía ese aminoácido en la posición especificada. Los experimentos que utilizaron [³H]-Phe y los experimentos con hidroxí ácidos demostraron que solamente los aminoácidos deseados se incorporan en la posición especificada por el codón UAG y que este aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio en la proteína. Véase, por ejemplo, Noren, y col., mencionado anteriormente, Kobayashi y col., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; y, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*. 255(5041): 197-200 (1992).

Un ARNt se puede aminoacilar con un aminoácido deseado a través de cualquier método o técnica, incluyendo, pero no limitado a, aminoacilación química o enzimática.

- 5 La aminoacilación se puede lograr mediante aminoacil ARNt sintetasas o mediante otras moléculas enzimáticas, incluyendo, pero no limitado a, ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y colaboradores (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle y col., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) demostraron la presencia de ARN natural que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque sólo se ha mostrado que estos catalizadores de ARN naturales actúan en sustratos de ácido ribonucleico para escisión y corte y empalme, el reciente desarrollo de evolución artificial de ribozimas ha expandido el repertorio de 10 catálisis a diversas reacciones químicas. Los estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces de aminoacil-ARN en sus propios extremos (2')3' (Illangakekare y col., 1995 *Science* 267:643-647) y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido de una molécula de ARN a otra (Lohse y col., 1996, *Nature* 381:442-444).
- 15 15 La Publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2003/0228593, describe métodos para construir ribozimas y su uso en aminoacilación de ARNt con aminoácidos codificados naturales y no naturales. Las formas inmovilizadas de sustrato de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar ARNt, incluyendo, pero no limitado a, ribozimas, pueden permitir la purificación de afinidad eficaz de los productos aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sepharosa y perlas magnéticas. La producción y uso de una forma inmovilizada de sustrato de ribozima para aminoacilación se describe en *Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084 y publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2003/0228593.
- 20 25 Los métodos de aminoacilación química incluyen, entre otros, los introducidos por Hecht y col. (Hecht, S. M, *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. *Biochemistry* 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. *Biol. Chem.* 1978, 253, 4517) y por Schultz, Chamberlin, Dougherty y otros (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P.G. *Science* 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8013; Bain, J. D. y col., *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti, y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. y col. *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. y col. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. y col. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), para evitar el uso de 30 sintetasas en la aminoacilación. Tales métodos u otros métodos de aminoacilación química se pueden utilizar para aminoacilar moléculas de ARNt.
- 35 35 Los métodos para generar ARN catalítico pueden implicar generar grupos separados de secuencias de ribozimas aleatorias, realizar evolución dirigida en los grupos, explorar los grupos con respecto a actividad de aminoacilación deseable y seleccionar secuencias de las ribozimas que muestran actividad de aminoacilación deseada.
- 40 45 Las ribozimas pueden comprender motivos y/o regiones que facilitan la actividad de acilación, por ejemplo un motivo de GGU y una región con alto contenido de U. Por ejemplo, se ha indicado que las regiones con alto contenido de U pueden facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácidos y un motivo GGU puede formar pares de bases con los extremos 3' de un ARNt. En combinación, el GGU y motivo y región con alto contenido de U facilitan el reconocimiento simultáneo tanto del aminoácido como del ARNt simultáneamente y de este modo facilitan la aminoacilación del extremo 3' del ARNt.
- 50 50 45 Se pueden generar ribozimas por selección *in vitro* utilizando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con tRNA^{Asn}_{CCCG}, seguido de la obtención por ingeniería genética sistemática de una secuencia consenso hallada en los clones activos. Un ribozima a modo de ejemplo obtenido a través de este método se denomina "ribozima Fx3" y se describe en la solicitud de publicación de EE.UU. N.º 2003/0228593, actúa como un catalizador versátil para la síntesis de diversos aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales afines.
- 55 60 55 Se puede utilizar inmovilización en un sustrato para permitir la purificación de afinidad eficaz de los ARNt aminoacilados. Algunos ejemplos de sustratos adecuados incluyen, entre otros, agarosa, sepharosa y perlas magnéticas. Las ribozimas se pueden inmovilizar en resinas aprovechando la estructura química del ARN, tal como el 3'-cis-diol en el ribosa de ARN que se puede oxidar con peryodato para producir el dialdehído correspondiente para facilitar la inmovilización del ARN en la resina. Se pueden utilizar diversos tipos de resinas incluyendo resinas de hidrazida económicas en las que la aminación reductiva hace de la interacción entre la resina y la ribozima un enlace irreversible. Se puede facilitar significativamente la síntesis de aminoacil-ARNt mediante esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis y col. *Methods* 2005; 36:239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.
- 65 65 60 El aislamiento de los ARNt aminoacilados se puede lograr de diversas maneras. Un método adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón, por ejemplo una solución de acetato sódico con 10 mM EDTA, un tampón que contiene 50 mM N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(3-ácido propanosulfónico), 12,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM EDTA o simplemente agua tamponada con EDTA (pH 7,0).

- Los ARNt aminoacilados se pueden añadir a reacciones de traducción para incorporar el aminoácido con el que el ARNt se aminoaciló en una posición seleccionada en un polipéptido compuesto a través de la reacción de traducción. Algunos ejemplos de sistemas de traducción en los que los ARNt aminoacilados de la presente invención se pueden utilizar, incluyen, entre otros, lisados celulares. Los lisados celulares proporcionan componentes de reacción necesarios para traducción *in vitro* de un polipéptido a partir de un ARNm de entrada. Algunos ejemplos de tales componentes de reacción incluyen, pero no se limitan a, proteínas ribosomales, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de inicio de la traducción y elongación y factores adicionales asociados con la traducción. Adicionalmente, los sistemas de traducción pueden ser traducciones discontinuas o traducción compartimentalizada. Los sistemas de traducción discontinuas combinan componentes de reacción en un compartimento sencillo mientras que los sistemas de traducción compartimentalizados separan los componentes de reacción de traducción de los productos de reacción que pueden inhibir la eficacia de la traducción. Los sistemas de traducción están disponibles en el mercado.
- Además, se puede utilizar un sistema de transcripción/traducción acoplado. Los sistemas de transcripción/traducción acoplados posibilitan la transcripción de un ADN de entrada a un ARNm correspondiente, que a su vez se traduce por los componentes de reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplado disponible en el mercado es el Sistema de Traducción Rápida (RTS, Roche Inc.) El sistema incluye una mezcla que contiene lisado de *E. coli* para proporcionar componentes traduccionales, por ejemplo ribosomas y factores de traducción. Adicionalmente, se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN de entrada en un molde de ARNm para su uso en la traducción. El RTS puede utilizar compartimentalización de los componentes de reacción por medio de una membrana interpuesta entre los compartimentos de reacción, incluso un compartimento de suministro/restos y un compartimento de transcripción/traducción.
- La aminoacilación de ARNt se puede realizar mediante otros agentes, incluyendo, pero no limitado a, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.
- Stephan en Scientist 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe métodos adicionales para incorporar aminoácidos codificados de modo no natural en proteínas. Lu y col. en Mol Cell. 2001 Oct; 8(4):759-69 describen un método en el que una proteína se liga químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (ligamiento de proteína expresada).
- También se han utilizado técnicas de microinyección para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Véase, por ejemplo, M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Science, 268:439 (1995); y, D. A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000). Se coinyectaron en un oocito de *Xenopus* dos especies de ARN preparadas *in vitro*: un ARNm que codificaba la proteína diana con un codón de parada UAG en la posición del aminoácido de interés y un ARN supresor ámbar aminoacilado con el aminoácido no natural deseado. La maquinaria de traducción del oocito después inserta el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este método ha permitido estudios de función estructural *in vivo* de proteínas de membrana integrales, que generalmente no son aptos para sistemas de expresión *in vitro*. Los ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor de taquicinina neurokinina-2 para medir distancias mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, véase, por ejemplo, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel y A. Chollet, L Biol. Chem., 271:19991 (1996); la incorporación de aminoácidos biotinilados para identificar restos expuestos en superficie en canales iónicos, véase, por ejemplo, J. P. Gallivan, H. A. Lester y D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997); el uso de análogos de tirosina enjaulados para controlar cambios conformacionales en un canal de iones en tiempo real, véase, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998); y el uso de alfa hidroxi aminoácidos para cambiar las estructuras de un canal iónico para explorar sus mecanismos de apertura. Véase, por ejemplo, P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Cell, 96:89 (1999); y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz y J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001).
- La capacidad de incorporar aminoácidos no naturales directamente en proteínas *in vivo* ofrece diversas ventajas, incluyendo, pero no limitado a, altos rendimientos de proteínas mutantes, facilidad técnica, el potencial para estudiar las proteínas mutantes en células o posiblemente en organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos de diagnóstico. La capacidad de incluir aminoácidos no naturales con distintos tamaños, acideces, nucleofilia, hidrofobicidades y otras propiedades en proteínas puede expandir en gran medida la capacidad de manipular racional y sistemáticamente las estructuras de proteínas, tanto para explorar la función proteica como para crear nuevas proteínas u organismos con nuevas propiedades.
- En un intento de incorporar en sitios específicos para-F-Phe, se utilizó un par ARNtPheCUA supresor ámbar de levadura/fenialanil-ARNt sintetasa en una cepa de *Escherichia coli* auxótrofa de Phe resistente a p-F-Phe. Véase, por ejemplo, R. Furter, Protein Sci., 7:419(1998).
- También es posible obtener expresión de un polinucleótido de relaxina de la presente invención utilizando un sistema de traducción sin células (*in vitro*). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o sin células y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celulares incluyen, pero no se limitan a, preparaciones

celulares completas, por ejemplo células permeabilizadas o cultivos celulares en los que una secuencia de ácido nucleico deseada se puede transferir a ARN y el ARNm se puede traducir. Están disponibles en el mercado sistemas de traducción sin células y se conocen bien muchos tipos de sistemas diferentes. Ejemplos de sistemas sin células incluyen, pero no se limitan a, lisados procariotas, tales como lisados de *Escherichia coli*, y lisados eucariotas, por ejemplo extractos de germen de trigo, lisados de células de insecto, lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo y lisados de células humanas. Se pueden preferir extractos o lisados eucariotas cuando la proteína resultante está glucosilada, fosforilada o modificada de otro modo debido a que muchas de las modificaciones solamente son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles en el mercado (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). También están disponibles extractos membranosos, tales como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsómicas, que son útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que pueden incluir ARNm como un molde (traducción *in vitro*) o ADN como un molde (transcripción y traducción *in vitro* combinadas), la síntesis *in vitro* se dirige por los ribosomas. Se ha aplicado un considerable esfuerzo al desarrollo de sistemas de expresión de proteínas sin células. Véase, por ejemplo, Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74:309-316 (2001); Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); y Patnaik, R. y J.R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); patente de EE.UU. N.º 6.337.191; publicación de patente de EE.UU. N.º 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785. Otro enfoque que se puede aplicar a la expresión de polipéptidos de relaxina que comprenden un aminoácido codificado de modo no natural incluye la técnica de fusión de péptido-ARNm. Véase, por ejemplo, R. Roberts y J.Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, y col., Chemistry & Biology 10:1043-1050 (2003). En este enfoque, un molde de ARNm unido a una puromicina se traduce a péptido en el ribosoma. Si se ha modificado una o más moléculas de ARNt, también se pueden incorporar aminoácidos no naturales en el péptido. Después de que se ha leído el último codón de ARNm, la puromicina captura el extremo carboxilo terminal del péptido. Si se descubre que el conjugado de ARNm-péptido resultante tiene propiedades interesantes en un ensayo *in vitro*, su identidad se puede revelar fácilmente a partir de la secuencia de ARNm. De esta manera, se pueden explorar bibliotecas de polipéptidos de relaxina que comprenden uno o más aminoácidos codificados de modo no natural para identificar polipéptidos que tengan propiedades deseadas. Más recientemente, se han presentado traducciones de ribosomas *in vitro* con componentes purificados que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos codificados de modo no natural. Véase, por ejemplo, A. Forster y col., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

También se pueden utilizar sistemas de traducción reconstituidos. También se han utilizado mezclas de factores de traducción purificados de forma exitosa para traducir ARNm a proteína así como combinaciones de lisados o lisados complementados con factores de traducción purificados, por ejemplo factor de inicio-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α o β), factor de elongación T (EF-Tu) o factores de terminación. Los sistemas sin células también pueden ser sistemas de transcripción/traducción acoplados en los que se introduce ADN al sistema, se transcribe ARNm y el ARNm se traduce como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col. editores, Wiley Interscience, 1993), que se incorpora en el presente por referencia. El ARN transcrit en sistema de transcripción eucariota puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARNhn) o ARN maduro con extremos 5' terminales (7-metil guanosina) y cola de poli A en el extremo 3', que pueden ser una ventaja en determinados sistemas de traducción. Por ejemplo, los ARNm protegidos se traducen con alta eficacia en el sistema de lisado de reticulocitos.

Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos de relaxina

Se pueden efectuar diversas modificaciones a los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente utilizando las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritas en el presente documento. Estas modificaciones incluyen la incorporación de funcionalidad adicional en el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, un marcador; un tinte; un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un fotoentrecruzador; un radionucleido; un compuesto citotóxico; un fármaco; un marcador de afinidad; un marcador de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metal; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido; un dendrímero soluble en agua; una ciclodextrina; ácido ribonucleico inhibidor; un biomaterial; una nanopartícula; un marcador de espín; un fluoróforo; una porción que contiene metal; una porción radioactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa por enlace covalente o no covalente con otras moléculas; una porción fotoliberadora; una porción excitable por radiación actínica; una porción fotoisomerizable; biotina; un derivado de biotina; un análogo de biotina; una porción que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo photoescindible; una cadena lateral alargada; un azúcar unido a carbono; un agente de reducción activo; un aminotioácido; una porción tóxica; un grupo etiquetado isotópicamente; una sonda biofísica; un grupo fosforecente; un grupo quimioluminiscente; un grupo electrodenso; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo; un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo; un marcador detectable; una molécula pequeña; un punto cuántico; un nanotransmisor; un radionucleótido; un radiotransmisor; un agente de captura de neutrones; o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. Como ejemplo no limitante ilustrativo de las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritos en el presente, la siguiente descripción se centrará en la adición de polímeros macromoleculares al polipéptido de aminoácidos no

naturales con el entendimiento de que las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritos para ello también son aplicables (con modificaciones apropiadas, si fuera necesario y para las que un experto en la materia podría hacer con las divulgaciones del presente documento) para añadir otras funcionalidades, incluyendo, pero no limitado a, las enumeradas anteriormente.

5 Una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas se pueden unir a los polipéptidos de relaxina de la presente invención para modular las propiedades biológicas del polipéptido de relaxina o proporcionar nuevas propiedades biológicas a la molécula de relaxina. Estos polímeros macromoleculares pueden unirse al polipéptido de Relaxina mediante un aminoácido codificado natural, mediante un aminoácido codificado de modo no natural, 10 cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede ser de un amplio intervalo, incluyendo, pero no limitado a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero no limitado a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 15

15 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas 20 realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

25 La presente invención proporciona preparaciones sustancialmente homogéneas de conjugados polímero:proteína. "Sustancialmente homogéneo", como se usa en el presente documento, significa que se observa que las moléculas de conjugado polímero:proteína son mayores que la mitad de la proteína total. El conjugado del polímero:proteína tiene actividad biológica y las presentes preparaciones de polipéptidos de relaxina PEGilados "sustancialmente homogéneos" proporcionados en el presente son las que son suficientemente homogéneas para presentar las 30 ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad de aplicación clínica en la predictibilidad de farmacocinética de lote a lote.

35 También se puede elegir preparar una mezcla de moléculas de conjugado polímero:proteína y la ventaja proporcionada en el presente documento es que se puede seleccionar la proporción de conjugado mono-polímero:proteína para incluir en la mezcla. Por lo tanto, si se desea, se puede preparar una mezcla de diversas proteínas con diversos números de fracciones de polímeros unidos (es decir, di-, tri-, tetra-, etc.) y combinar los conjugados con el conjugado mono-polímero:proteína preparado usando los métodos de la presente invención y tener una mezcla con una proporción predeterminada de conjugados de mono-polímero:proteína.

40 El polímero seleccionado puede ser soluble en agua de modo que la proteína con la que se une no precipita en un ambiente acuoso, por ejemplo un ambiente fisiológico. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. El polímero será farmacéuticamente aceptable para el uso terapéutico de la preparación del producto final.

45 Algunos ejemplos de polímeros incluyen, pero no se limitan a, polialquil éteres y análogos con extremos protegidos por alcoxi de los mismos (por ejemplo, polioxietilenglicol, polioxietilen/propilenglicol y análogos con extremos protegidos por metoxi o epoxi de los mismos, especialmente polioxietilenglicol, conociéndose este último también como polietilenglicol o PEG); polivinilpirrolidonas; polivinilalquil éteres; polioxazolinas, polialquil oxazolinas y polihidroxialquil oxazolinas; poliacrilamidas, polialquil acrilamidas y polihidroxialquil acrilamidas (por ejemplo, polihidroxipropilmetacrilamida y derivados de la misma); polihidroxialquil acrilatos; ácidos polisiálicos y análogos de los mismos; secuencias de péptidos hidrófilos; polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, por ejemplo, carboximetildextrano, dextrano sulfatos, aminodextrano; celulosa y sus derivados, por ejemplo, carboximetil celulosa, hidroxialquil celulosas; quitina y sus derivados, por ejemplo, quitosán, succinil quitosán, carboxiraetilquitina, carboximetilquitosán; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; condroitín sulfato; albúmina; pululano y carboximetil pululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, por ejemplo, ácidos poliglutámicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de anhídrido maleico de estireno, copolímero de diviniletil éter y anhídrido maleico; alcoholes polivinílicos; copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores.

60 La proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de proteína variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, se puede determinar la relación óptima (con respecto a eficacia de reacción debido a que hay un exceso mínimo de proteína o polímero que no ha reaccionado) por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y por el número de grupos reactivos disponibles. En relación con el peso molecular, normalmente cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas de polímero que se pueden unir a la proteína. De forma similar, la ramificación del polímero debería tenerse en cuenta cuando se optimizan estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o haya más ramas) mayor será la relación de

polímero:proteína.

Como se usa en el presente documento, y cuando se contemplan conjugados de PEG:polipéptido de relaxina, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona el beneficio deseado a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, incluyendo la condición física global del paciente y la causa subyacente de la afección que se tiene que tratar. La cantidad de polipéptido de relaxina utilizada para terapia proporciona una tasa aceptable de cambio y mantiene la respuesta deseada a un nivel beneficioso. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones usando materiales y procesos públicamente disponibles.

El polímero soluble en agua puede ser cualquier forma estructural incluyendo, pero no limitado a, lineal, bifurcado o ramificado. normalmente, el polímero soluble en agua es un polí(alquilenglicol), por ejemplo poli(etilenglicol)(PEG), pero también pueden emplearse otros polímeros solubles en agua. A modo de ejemplo, se utiliza PEG para describir determinadas realizaciones de la presente invención.

El PEG es un polímero soluble en agua bien conocido que está disponible en el mercado o que se puede preparar por polimerización por apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la materia (Sandler y Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se utiliza ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta el tamaño o la modificación en un extremo del PEG y se puede representar como unido al polipéptido de relaxina por la fórmula:



en donde n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluyendo, pero no limitado a, un alquilo C₁₋₄, un grupo protector o un grupo funcional terminal.

En algunos casos, un PEG utilizado en la invención termina en un extremo con hidroxi o metoxi, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi PEG"). Alternativamente, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando así un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se utilizan habitualmente para reaccionar con los grupos funcionales hallados en los 20 aminoácidos comunes (incluyendo, pero no limitado a, grupos maleimido, carbonatos activados (incluyendo, pero no limitado a, p-nitrofenil éster), ésteres activados (incluyendo, pero no limitado a, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenilo éster) y alehídos) así como grupos funcionales que son inertes para los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos codificados de modo no natural (incluyendo, pero no limitado a, 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 de relaxina mediante aminoácido no natural o codificado de modo no natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace de urea, amida o carbamato con un grupo amina (incluyendo, pero no limitado a, la amina épsilon de lisina o el extremo amino terminal) del polipéptido. Alternativamente, Y puede ser un enlace de maleimida con un grupo tiol (incluyendo, pero no limitado a, el grupo tiol de cisteína). Alternativamente, Y puede ser un enlace con un resto no accesible habitualmente mediante los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un grupo azida en el PEG con un grupo alquino en el polipéptido de relaxina para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Alternativamente, se puede hacer reaccionar un grupo alquino en el PEG con un grupo azida presente en un aminoácido codificado de modo no natural para formar un producto similar. En algunas realizaciones, se puede hacer reaccionar un nucleófilo fuerte (incluyendo, pero no limitado a, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida) con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido codificado de modo no natural para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según sea aplicable, que en algunos casos se puede reducir adicionalmente por tratamiento con un agente reductor apropiado. Alternativamente, el nucleófilo fuerte se puede incorporar en el polipéptido de relaxina mediante un aminoácido codificado de modo no natural y se puede utilizar para reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero soluble en agua.

Se puede utilizar cualquier masa molecular para un PEG según se desee de forma práctica, incluyendo, pero no limitado a, de aproximadamente 100 Dalton (Da) a 100.000 Da o más según se desee (incluyendo, pero no limitado a, en ocasiones 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). El peso molecular del PEG puede ser de un amplio intervalo, incluyendo, pero no limitado a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero no limitado a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. También se puede utilizar PEG de cadena ramificada, incluyendo, pero no limitado a, moléculas de PEG en las que cada cadena tiene un MW que varía de 1 a 100 kDa (incluyendo, pero no limitado a, 1-

50 kDa o 5-20 kDa). El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser, incluyendo, pero no limitado a, entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero no limitado a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da y 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Se describe una amplia serie de moléculas de PEG, incluyendo, pero no limitado a, en el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., catálogo de Nektar Therapeutics, que se incorporan al presente por referencia.

15 Generalmente, al menos un extremo terminal de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido codificado de modo no natural. Por ejemplo, se pueden utilizar derivados de PEG que portan fracciones alquino y azida para reacción con cadenas laterales de aminoácidos para unir PEG a aminoácidos codificados de modo no natural como describe en el presente documento. Si el aminoácido codificado de modo no natural comprende una azida entonces el PEG normalmente, tendrá una porción alquino para efectuar formación del producto de cicloadición [3+2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato), que contiene un grupo fosfino para efectuar la formación del enlace de amida. Alternativamente, si el aminoácido codificado de modo no natural comprende un alquino, entonces el PEG normalmente contendrá una porción azida para efectuar la formación del producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Si el aminoácido codificado de modo no natural comprende un grupo carbonilo, el PEG normalmente comprenderá un nucleófilo potente (incluyendo, pero no limitado a, una funcionalidad de hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida) para efectuar la formación de enlaces de hidrazone, oxima y semicarbazona correspondientes, respectivamente. En otras alternativas, se puede utilizar una orientación inversa de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, una porción azida en el aminoácido codificado de modo no natural se puede hacer reaccionar con un derivado de PEG que contiene un alquino.

20 30 En algunas realizaciones, la variante del polipéptido de relaxina con un derivado de PEG contienen una funcionalidad química que es reactiva con la funcionalidad química presente en la cadena lateral de los aminoácidos codificados de modo no natural.

25 35 La invención proporciona en algunas realizaciones derivados de polímero que contienen azida y acetileno que comprenden una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da. La estructura polimérica del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, se entenderá que una amplia diversidad de polímeros solubles en agua, incluyendo, pero no limitado a, polí(etilen)glucol y otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y polí(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli (etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas de tales moléculas. El término PEG incluye, entre otros, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG con múltiples ramas, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes de la estructura polimérica) o PEG con enlaces degradables en el mismo.

40 45 El PEG es normalmente transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable frente al calor, inerte para muchos agentes químicos, no hidroliza ni se deteriora y generalmente no es tóxico. Se considera que el poli(etilenglicol) es biocompatible, lo que significa que PEG puede coexistir con tejidos u organismos vivos sin causarles daño. Más específicamente, PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, por ejemplo un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de modo que un organismo puede tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG no tienden a producir una respuesta inmune considerable o provocar coagulación u otros efectos no deseables. El PEG que tienen la fórmula $--\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}--(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n--\text{CH}_2\text{CH}_2--$, en donde n es de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4000, normalmente de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 2000, es adecuado para uso en la presente invención. PEG que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, en algunas realizaciones de la presente invención, es particularmente útil como la estructura polimérica. El peso molecular del PEG puede ser de un amplio intervalo, incluyendo, pero no limitado a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de PEG puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero no limitado a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de

50 55 60 65

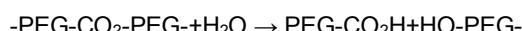
PEG es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

5 La estructura polimérica puede ser lineal o ramificada. Las estructuras poliméricas ramificadas generalmente se conocen en la técnica. normalmente, un polímero ramificado tiene una porción principal de rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de rama central. PEG se utiliza habitualmente en formas ramificadas que se pueden preparar por adición de óxido de etileno a diversos polioles, por ejemplo glicerol, oligómeros de glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La porción de la rama central también se puede obtener a partir de 10 varios aminoácidos, por ejemplo lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como R(-PEG-OH)_m en donde R deriva de una porción principal, por ejemplo glicerol, oligómeros de glicerol o pentaeritritol y m representa el número de ramas. También se pueden utilizar moléculas de PEG con múltiples ramas como la 15 estructura polimérica, por ejemplo las descritas en las patentes de EE.UU. N.º 5.932.462; 5.643.575; 5.229.490; 4.289.872; solicitud de patente de EE.UU. 2003/0143596; WO 96/21469; y WO 93/21259.

15 El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por PEG(--YCHZ₂)_n, en 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.

20 Otra forma ramificada más, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, por ejemplo carboxilo, a lo largo de la estructura de PEG en lugar del 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 25 estructura. Por ejemplo, PEG se puede preparar con enlaces de éster en la estructura polimérica que se someten a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis provoca la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo:



30 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 no limitado a, las desveladas en el presente documento.

Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, las 35 estructuras poliméricas que son solubles en agua, de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Algunos ejemplos de adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli (alquilenglicoles), por ejemplo poli(propilenglicol) (PPG), copolímeros de los mismos (incluyendo, pero no limitado a, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede variar, éste está normalmente en el intervalo de entre 40 aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, con frecuencia de entre aproximadamente 6.000 Da y aproximadamente 80.000 Da. El peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo, pero no limitado a, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

45 Aquellos expertos en la materia reconocerán que la lista anterior para las estructuras sustancialmente solubles en agua no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso en la presente invención.

50 En algunas realizaciones de la presente invención, los derivados de polímeros son "multifuncionales", lo que significa que la estructura polimérica tiene al menos dos extremos y posiblemente hasta aproximadamente 300 extremos, 55 funcionalizados o activados con un grupo funcional. Los derivados de polímeros multifuncionales incluyen, entre otros, polímeros lineales que tienen dos extremos, cada extremo terminal enlazado a un grupo funcional que puede ser el mismo o diferente.

60 En una realización, el derivado de polímero tiene la estructura:

65



en donde:

5 N=N=N es una porción azida;

B es una porción de unión, que puede estar presente o ausente;

POLI es un polímero soluble en agua no antigénico;

10 A es una porción de enlace, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y
X es un segundo grupo funcional.

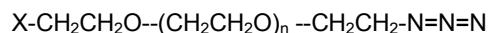
15 Algunos ejemplos de una porción de unión para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1 y 10 átomos de carbono. Un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre se puede incluir con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una porción de enlace para A y B incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 10, y puede contener entre 5 y 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de
20 grupos de unión adecuados incluyen aquellos grupos de unión descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de patente de EE.UU. 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior para las fracciones de unión no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que todas las fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso
25 en la presente invención.

25 Algunos ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, éster activo, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimidilo y ésteres de 1-benzotriazolilo, carbonato activo, tales como carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminoxy, amina
30 protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, gioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y azida. Como se entiende por los expertos en la materia, la porción X
35 seleccionada debe ser compatible con el grupo azida para que la reacción con el grupo azida no ocurra. Los derivados de polímeros que contienen azida pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una porción azida, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

40 El término "protegido" se refiere a la presencia de un grupo protector o porción que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se protege. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar del grupo de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfido. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, por ejemplo ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un grupo bencílo o un grupo alquilo tales como metilo, etilo o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en la técnica también se pueden utilizar en la presente invención.

45 Algunos ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la bibliografía incluyen, pero no se limitan a, carbonato de N-succinimidilo (véase por ejemplo, patentes de EE.UU. N.º 5.281.698, 5.468.478), amina (véase por ejemplo, Buckmann y col. Makroniol, Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky y col. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (Véase, por ejemplo, Andrezs y col. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, por ejemplo, Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también patente de EE.UU. N.º 5.672.662), succinato de succinimidilo (Véase, por ejemplo, Abuchowski y col. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) y Joppich y col. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), éster succinimidilo (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.650.234), éter glicidilo (véase, por ejemplo, Pitha y col. Eur. J. Biochem. 94:11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, por ejemplo, Beauchamp, y col., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli y col. J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, por ejemplo, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, por ejemplo, Harris y col. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), patente de EE.UU. N.º 5.824.784, patente de EE.UU. N.º 5.252.714), maleimida (véase, por ejemplo, Goodson y col. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani y col. en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridildisulfuro (véase, por ejemplo, Woghiren, y col. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (véase, por ejemplo, Sawhney y col., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.900.461).

En ciertos casos de la presente invención, los derivados de polímeros comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:



en donde:

X es un grupo funcional como describe anteriormente; y

10 n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

En otro caso, los derivados de polímeros de la divulgación comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:



en donde:

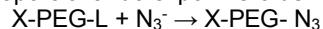
W es una porción de unión alifática o aromática que comprende entre 1 y 10 átomos de carbono;

20

Yannick Gouin, Sébastien Léveillé, and Sébastien Léveillé, *Journal of Health Politics, Policy and Law*, Vol. 41, No. 4, 2016, pp. 1061–1088, DOI 10.1215/03616878-1283000 © 2016 by the author(s). Published by The University of Chicago Press on behalf of the Southern Political Science Association.

25 Los derivados de PEG que contienen azida se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento. En un método, que se muestra a continuación, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, la estructura polimérica tiene un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con un anión de azida (que puede estar emparejado con cualquiera de varios contraíones adecuados, incluyendo sodio, potasio, terc-butilamonio y así sucesivamente). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la porción azida, proporcionando el polímero de PEG que contiene azida deseado.

30

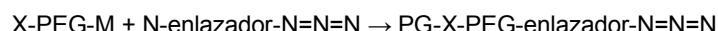


35 Como se muestra, una estructura polimérica adecuada para su uso en la presente invención tiene la fórmula X-PEG-L, en donde PEG es polí(etylenglicol) y X es un grupo funcional que no reacciona con los grupos azida y L es un grupo saliente adecuado. Algunos ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, hidroxilo protegido, acetal, alquenilo, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, maleimida, ditiopiridina y vinilpiridina y cetona. Algunos ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, entre otros, cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato.

40

En otro método para la preparación de los derivados de polímeros que contienen azida de la presente divulgación, un agente de unión que tiene una funcionalidad azida se pone en contacto con una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, en donde el agente de unión tiene una funcionalidad química que reaccionará selectivamente con una funcionalidad química en el polímero de PEG, para formar un producto del derivado de polímero que contiene azida en donde azida se separa de la estructura polimérica por un grupo de enlace.

A continuación se muestra un esquema de reacción a modo de ejemplo:



en donde:

55 PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo protector terminal, por ejemplo alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y

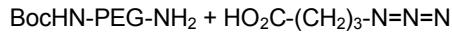
M es un grupo funcional que no reacciona con la funcionalidad azida pero que reaccionará de forma eficaz y selectiva con el grupo funcional N.

60 Algunos ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, M siendo un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M siendo una cetona si N es una porción hidrazida o aminooxi; M siendo un grupo saliente si N es un nucleófilo.

65 La purificación del producto en bruto se puede realizar a través de métodos conocidos incluyendo, pero no limitado a, la precipitación del producto, seguido de cromatografía, si es necesario.

A continuación se muestra un ejemplo más específico en el caso de PEG diamina, en el que una de las aminas está protegida por una porción del grupo protector, por ejemplo terc-butil-Boc y la PEG diamina mono-protectora resultante reacciona con una porción de unión que tiene la funcionalidad azida:

5



En este caso, el grupo amina se puede acoplar al grupo de ácido carboxílico usando diversos agentes de activación, por ejemplo reactivos de cloruro de tionilo o carbodiimida y N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol para crear un enlace amida entre el derivado de PEG monoamina y la porción de unión que lleva la azida. Después de la formación exitosa del enlace amida, se puede utilizar el derivado que contiene azida N-terc-butil-Boc-protectido resultante directamente para modificar las moléculas bioactivas, o se puede elaborar adicionalmente para instalar otros grupos funcionales útiles. Por ejemplo, el grupo N-t-Boc se puede hidrolizar por tratamiento con un ácido fuerte para generar una omega-amino-PEG-azida. La amina resultante puede usarse como un mango sintético para instalar otra funcionalidad útil, por ejemplo grupos maleimida, disulfuros activados, ésteres activados y así sucesivamente, para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

20 Los derivados heterobifuncionales son particularmente útiles cuando se desea unir diferentes moléculas a cada extremo terminal del polímero. Por ejemplo, el omega-N-amino-N-azido PEG permitirá la unión de una molécula que tiene un grupo electrófilo activado, por ejemplo un aldehído, cetona, éster activado, carbonato activado, y así sucesivamente, a un extremo terminal del PEG y una molécula que tiene un grupo acetileno al otro extremo terminal del PEG.

En otro caso, el derivado de polímero tiene la estructura:

25



en donde:

30 R puede ser H o un grupo alquilo, alqueno, alcoxi o arilo o arilo sustituido;

B es una porción de unión, que puede estar presente o ausente; POLI es un polímero soluble en agua no antígenico;

35 A es una porción de unión, que puede estar presente o ausente y que puede ser igual que B o diferente; y

X es un segundo grupo funcional.

40 Algunos ejemplos de una porción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1 y 10 átomos de carbono. Un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre se puede incluir con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una porción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 10, y puede contener entre 5 y 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen aquellos grupos de unión descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.932.462 y 5.643.575; y la publicación de patente de EE.UU. 2003/0143596. Los expertos en la materia reconocerán que la lista anterior para las fracciones de unión no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que varias fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como útiles en la presente divulgación.

45

50 Ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, éster activo, por ejemplo ésteres N-hidroxisuccinimídilo y ésteres 1-benzotriazolilo, carbonato activo, por ejemplo carbonatos de N-hidroxisuccinimídilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, 55 ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Como se entenderá, la porción X seleccionada debe ser compatible con el grupo acetileno para que la reacción con el grupo acetileno no ocurra. Los derivados de polímeros que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una porción acetileno, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

⁶⁰ See, for example, the discussion of the 1994 Constitutional Conference in the section on the Constitutional Conference.



25

X es un grupo funcional como describe anteriormente;

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

5 m está entre 1 y 10.

A continuación se muestran ejemplos específicos de cada uno de los polímeros de PEG heterobifuncionales.

10 Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención se pueden preparar mediante métodos conocidos para los expertos en la materia y/o desvelados en el presente documento. En un método, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, la estructura polimérica tiene un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con compuesto que tiene tanto una funcionalidad acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando el polímero de PEG que tiene la porción nucleófila y la molécula que tiene el grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la porción nucleófila, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado.



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

25 Ejemplos de Nu incluyen, pero no se limitan a, amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidriilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxy que reaccionarán principalmente a través de un mecanismo del tipo SN2. Algunos ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen los grupos funcionales que reaccionarán principalmente a través de una reacción de adición nucleófila. Ejemplos de grupos L incluyen cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, tresilato y tosilato y otros grupos que se espera que experimenten desplazamiento nucleófilo, por ejemplo cetonas, aldehídos, tioésteres, olefinas, grupos carbonilo alfa-beta insaturados, carbonatos y otros grupos electrófilos que se espera que experimenten adición por nucleófilos.

30 En otro caso, A es un enlazador alifático de entre 1 y 10 átomos de carbono o un anillo arilo sustituido de entre 6 y 14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

35 En otro método para la preparación de los derivados de polímeros que contienen acetileno, un polímero de PEG que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, que lleva un grupo funcional protegido o un agente protector en un extremo terminal y un grupo saliente adecuado en otro extremo terminal, se pone en contacto mediante un anión de acetileno.

40 A continuación se muestra un esquema de reacción a modo de ejemplo:



en donde:

PEG es poli(etilenglicol) y X es un grupo protector terminal, por ejemplo alcoxi o un grupo funcional como se ha descrito anteriormente; y

50 R' es H, un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi o un grupo alquilo, alcoxi, arilo o ariloxi sustituido.

55 En el ejemplo anterior, el grupo saliente L debe ser lo suficientemente reactivo para experimentar un desplazamiento del tipo SN2 cuando se pone en contacto con una concentración suficiente del anión de acetileno. Las condiciones de reacción necesarias para realizar el desplazamiento de SN2 de grupos salientes por aniones de acetileno se conocen por los expertos en la materia.

La purificación del producto en bruto habitualmente se puede realizar a través de métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, la precipitación del producto seguido de cromatografía, si es necesario.

60 Los polímeros solubles en agua se pueden unir a los polipéptidos de relaxina de la invención. Los polímeros solubles en agua se pueden unir mediante un aminoácido codificado de modo no natural incorporado en el polipéptido de relaxina o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido codificado de modo no natural o natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido codificado de modo no natural o natural. Alternativamente, los polímeros solubles en agua se enlazan a un polipéptido de relaxina incorporado en un aminoácido codificado de modo no natural mediante un aminoácido natural (incluyendo, pero no limitado a, cisteína, lisina o el grupo amina del resto del terminal N). En algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención

comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos no naturales, en donde uno o más aminoácido o aminoácidos codificados de modo no natural están unidos a polímero o polímeros solubles en agua (incluyendo, pero no limitado a, PEG u oligosacáridos). En algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención comprenden adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos codificados naturales unidos a polímeros solubles en agua. En 5 algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención comprenden uno o más aminoácidos codificados de modo no natural unidos a polímeros solubles en agua y uno o más aminoácidos codificados naturales unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua utilizados en la presente invención potencian la vida media sérica del polipéptido de relaxina en relación con la forma no conjugada.

10 El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido de relaxina (es decir, el alcance de la PEGilación o glucosilación) de la presente invención puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (incluyendo, pero no limitado a, aumentada o reducida) tales como vida media *in vivo*. En algunas realizaciones, la vida media de la relaxina aumenta al menos aproximadamente un 10, un 20, un 30, un 40, un 50, un 60, un 70, un 80, un 90 por ciento, 2 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 15 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 50 veces o al menos aproximadamente 100 veces sobre un polipéptido no modificado.

20 **Derivados de PEG que contienen grupo nucleófilo fuerte (es decir, hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida)**

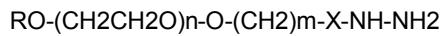
25 En una realización de la presente invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una porción hidrazina, hidroxilamina, hidrazida o semicarbazida terminal que se une directamente a la estructura de PEG.

25 En algunas realizaciones, el derivado de PEG hidroxilamina-terminal tendrá la estructura:



30 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrá la estructura:



35 en donde R es un alquilo sencillo (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.

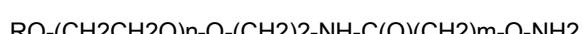
En algunas realizaciones, el derivado de PEG que contienen semicarbazida tendrá la estructura:



en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

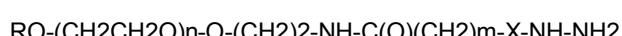
45 En otra realización de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una porción hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal que se une directamente a la estructura de PEG por medio de un enlace amida.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG hidroxilamina-terminal tendrán la estructura:



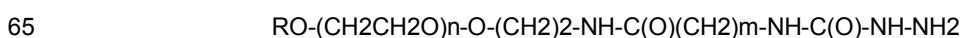
50 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5 y 40 kDa).

55 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contiene hidrazina o hidrazida tendrán la estructura:



60 en donde R es un alquilo sencillo (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.

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen semicarbazida tendrán la estructura:



en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000.

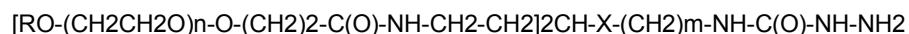
En otra realización de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene carbonilo se modifica con un derivado de PEG que contiene una porción hidroxilamina, hidrazida, hidrazina o semicarbazida terminal, con cada cadena del PEG ramificado que tiene un MW que varía de 10-40 kDa y, puede ser de 5-20 kDa.

En otra realización de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural se modifica con un derivado de PEG que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG hidrazina- o hidrazida-terminal tendrá la estructura:



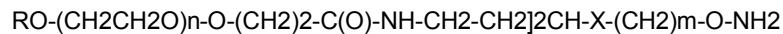
en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, n es 100-1.000 y X es opcionalmente un grupo carbonilo (C=O) que puede estar presente o ausente.

15 En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen semicarbazida tendrán la estructura:



20 en donde R es un alquilo sencillo (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:



en donde R es un alquilo sencillo (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.

30 El grado y sitios a los que se enlazan el polímero o polímeros solubles en agua con el polipéptido de relaxina pueden modular la unión del polipéptido de relaxina con el receptor de polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, los enlaces se disponen de modo que el polipéptido de relaxina se une al receptor de polipéptido de relaxina con una K_d de aproximadamente 400 nM o inferior, con una K_d de 150 nM o inferior, y en algunos casos con una K_d de 100 nM o inferior, como se mide por un ensayo de unión en equilibrio, tal como el descrito en Spencer y col., J. Biol. Chem., 263:7862-7867(1988).

35 Se describen métodos y química para activación de polímeros así como para conjugación de péptidos en la bibliografía y se conocen en la técnica. Los métodos que se utilizan habitualmente para activación de polímeros incluyen, pero sin limitación, activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, divinilulfona, carbodiimida, sulfonil haluros, triclorotriazina, etc. (véase, R. F. Taylor, 40 (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 y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American 45 Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

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

50 También pueden encontrarse métodos para activación de polímeros en el documento WO 94/17039, patente de EE.UU. N.º 5.324.844, el documento WO 94/18247, el documento WO 94/04193, patente de EE.UU. N.º 5.219.564, patente de EE.UU. N.º 5.122.614, el documento WO 90/13540, patente de EE.UU. N.º 5.281.698 y el documento 55 WO 93/15189, y para conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo, entre otros, Factor de Coagulación VIII (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula transportadora de oxígeno (patente de EE.UU. N.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App, Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)). Se lleva a cabo PEGilación (es decir, adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos de relaxina que contienen un aminoácido codificado de modo no natural, por ejemplo p-azido-L-fenilalanina, a través de cualquier método conveniente. Por ejemplo, se PEGila polipéptido de relaxina con un derivado de mPEG terminado con alquino. Brevemente, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH₂≡CH sólido, con agitación, a una solución acuosa de polipéptido de relaxina que contiene p-azido-L-Phe a temperatura ambiente. normalmente, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene una pKa cerca del pH al que se debe llevar a cabo la reacción (generalmente aproximadamente pH 4-10). Algunos ejemplos de tampones adecuados para PEGilación a pH 7,5, por ejemplo, incluyendo, pero no limitado a, HEPES, fosfato, borato, TRIS-HCl, EPPS, y TES. El pH se controla continuamente y se ajusta si es necesario. normalmente se permite que la reacción continúe durante 60 65

aproximadamente 1-48 horas.

Los productos de reacción se someten posteriormente a cromatografía de interacción hidrófoba para separar las variantes de polipéptido de relaxina PEGiladas de mPEG (5000)-O-CH₂-C≡CH libre y cualquier complejo de peso molecular alto del polipéptido de relaxina PEGilado que pueda formarse cuando se activa PEG no bloqueado en ambos extremos de la molécula, reticulando de este modo moléculas variantes del polipéptido de relaxina. Las condiciones durante la cromatografía de interacción hidrófoba son tales que mPEG (5000)-O-CH₂-C≡CH libre fluye a través de la columna, mientras que cualquier complejo de variante de polipéptido de relaxina PEGilado reticulado se eluye después de las formas deseadas, que contienen una molécula variante del polipéptido de relaxina conjugada con 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 se determinan fácilmente por los expertos en la materia. El eluyente que contiene los conjugados deseados se concentra por ultrafiltración y se desalada por diafiltración.

Si es necesario, el polipéptido de relaxina PEGilado obtenido de la cromatografía hidrófoba puede purificarse adicionalmente por uno o más procesos conocidos por los entendidos en la materia incluyendo, pero no limitado a, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluyendo, pero no limitado a, DEAE SEFAROSA); cromatografía en sílice, HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluyendo, pero no limitado a, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de quelato metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procesos electroforéticos (incluyendo, pero no limitado a, centrado isoelectrónico preparatorio), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitación precipitación de sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar por GPC por comparación con patrones de proteínas globulares (Preneta, AZ en PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado de relaxina-PEG se puede evaluar por degradación proteolítica (incluyendo, pero no limitado a, escisión con tripsina) seguido de análisis de espectrometría de masas. Pepinsky RB., y col., J. Pharmcol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

Un polímero soluble en agua enlazado a un aminoácido de un polipéptido de relaxina de la invención se puede derivatizar o sustituir adicionalmente sin limitación.

Derivados de PEG que contienen azida

En otro caso, se modifica un polipéptido de relaxina con un derivado de PEG que contiene una porción azida que reaccionará con una porción de alquino presente en la cadena lateral del aminoácido codificado de modo no natural.

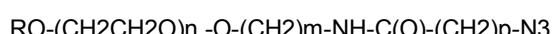
En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

En algunos casos, el derivado de PEG azido-terminal tendrá la estructura:



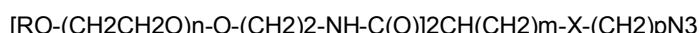
en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular promedio está entre 5-40 kDa).

45 En otro caso, el derivado de PEG azido-terminal tendrá la estructura:



50 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

En otro caso, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una porción azida terminal, teniendo cada cadena del PEG ramificado un MW que varía de 10-40 kDa y puede ser de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunos casos, el derivado de PEG azido-terminal tendrá la siguiente estructura:

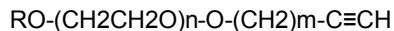


60 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), en cada caso que puede estar presente o ausente.

Derivados de PEG que contienen alquino

En otro caso, se modifica un polipéptido de relaxina con un derivado de PEG que contiene una porción alquino que reaccionará con una porción azida presente en la cadena lateral del aminoácido codificado de modo no natural.

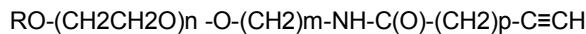
En algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:



- 5 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10 y n es 100-1.000 (es decir, el peso molecular medio está entre 5-40 kDa).

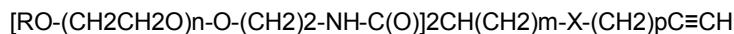
10 En otro caso, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene una porción azida terminal o alquino terminal que se une directamente a la estructura de PEG por medio de un enlace amida.

En algunos casos, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:



- 15 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000.

20 En otro caso, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene azida se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una porción alquino terminal, con cada cadena del PEG ramificado que tiene un MW que varía de 10-40 kDa y puede ser de 5-20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG alquino-terminal tendrá la siguiente estructura:

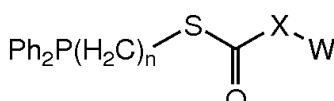


- 25 en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

Derivados de PEG que contienen fosfina

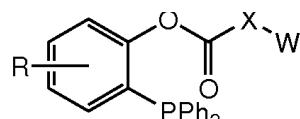
30 En otro caso, se modifica un polipéptido de relaxina con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (incluyendo, pero no limitado a, éster, carbonato) que comprende adicionalmente un grupo fosfina que reaccionará con una porción azida presente en la cadena lateral del aminoácido codificado de modo no natural. En general, los derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunos casos, de 10-40 kDa.

- 35 En algunos casos, el derivado de PEG tendrá la estructura:



- 40 en donde n es 1-10; X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo y W es un polímero soluble en agua.

En algunos casos, el derivado de PEG tendrá la estructura:



- 45 en donde X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, grupos alquilo sustituido y arilo sustituido. Grupos R a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, -CH₂, -C(CH₃)₃, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R'', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -CN y -NO₂. R', R'', R''' y R''' cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido y no sustituido, incluyendo, pero no limitado a, arilo sustituido con halógenos 1-3, alquilo sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R', R'', 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'' implica incluir, entre otros, 1-pirrolidinil y 4-morfolinil. Del análisis de sustituyentes anterior, el experto en la materia entenderá que el término "alquilo" implica incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquilo (incluyendo, pero no limitado a, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acil (incluyendo, pero no limitado a, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ y similares).

- 60 Otros derivados de PEG y técnicas de PEGilación generales

Otras moléculas de PEG a modo de ejemplo que se pueden enlazar a polipéptidos de relaxina, así como métodos de PEGilación incluyen, entre otros, los descritos en, por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 5 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0021763; patente de EE.UU. 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; 10 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 5.559.213; 5.747.646; 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, WO95/13090, 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, 15 WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en el presente se puede utilizar en cualquier forma, incluyendo, pero no limitado a, cadena sencilla, cadena ramificada, cadena de múltiples ramas, funcional sencilla, bifuncional, multifuncional o cualquier combinación de las mismas.

20 20 Derivados de PEG y polímeros adicionales que incluyen, pero no se limitan a, derivados de PEG hidroxilamina (aminooxi), se describen en las siguientes solicitudes de patentes: publicación de patente de EE.UU. N.2006/0194256, publicación de patente de EE.UU. N.º 2006/0217532, publicación de patente de EE.UU. N.º 2006/0217289, patente provisional estadounidense N.º 60/755.338; patente provisional estadounidense N.º 60/755.711; patente provisional estadounidense N.º 60/755.018; solicitud de patente internacional N.º 25 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; patente provisional estadounidense N.º 60/743,041; patente provisional estadounidense N.º 60/743,040; solicitud de patente internacional N.º PCT/US06/47822; patente provisional estadounidense N.60/882.819; patente provisional estadounidense N.º 60/882.500; y patente provisional estadounidense N.º 60/870.594.

30 Proteínas de fusión Fc heterólogas

35 Los compuestos de relaxina descritos anteriormente se pueden fusionar directamente o a través de un enlazador peptídico a la porción Fc de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas son moléculas que contienen cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro, que normalmente tienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. En cada cadena, un dominio (V) tiene una secuencia de aminoácidos variable dependiendo de la especificidad de anticuerpos de la molécula. Los otros dominios (C) tienen una secuencia bastante constante común a moléculas de la misma clase.

40 Como se usa en el presente documento, la porción Fc de una inmunoglobulina tiene el significado proporcionado habitualmente al término en el campo de la inmunología. Específicamente, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene eliminando las dos regiones de unión a antígeno (los fragmentos Fab) del anticuerpo. Un modo de eliminar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con la proteasa papaína. Por tanto, la porción Fc está formada por fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño de la región constante procedente de ambas cadenas pesadas, que se asocian mediante interacciones no covalentes y enlaces disulfuro. La porción Fc puede incluir las regiones bisagra y extenderse a través de los dominios CH2 y CH3 hasta el extremo carboxilo terminal del anticuerpo. Regiones bisagra representativas de inmunoglobulinas humanas y de ratón se pueden encontrar en Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C. A. K. ed., W. H. Freeman y Co., 1992, cuyos principios se incorporan en el presente por referencia. La porción Fc puede además incluir uno o más sitios de glucosilación. La secuencia de aminoácidos de una proteína Fc representativa que contiene una región bisagra, dominios CH2 y CH3 y un sitio de N-glucosilación se conocen en la técnica.

50 Hay cinco tipos de regiones Fc de inmunoglobulina humana con diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG es la inmunoglobulina más abundante en suero. La IgG también tiene la vida media más prolongada en suero de las inmunoglobulinas (23 días). Al contrario que otras inmunoglobulinas, la IgG se recircula de forma eficiente tras la unión a un receptor de Fc. Hay cuatro subclases de IgG, G1, G2, G3 y G4, cada una de las cuales tiene diferentes funciones efectoras. G1, G2 y G3 se pueden unir a C1q y fijar complemento pero G4 no. Aunque G3 puede unir C1q de manera más eficaz que G1, G1 es más eficaz al mediar la lisis celular dirigida al complemento. G2 fija complemento de forma ineficaz. El sitio de unión a C1q en IgG se ubica en la región carboxilo terminal del dominio CH2.

60 Todas las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64), siendo G1 y G3 más eficaces que G2 y G4. La región de unión al receptor de Fc de IgG está formada por los restos ubicados en las regiones bisagra y carboxilo terminal del dominio CH2.

65 La IgA puede existir tanto en forma monomérica como dimérica unidas por una cadena J. IgA es el segundo más abundante Ig en suero, pero tiene una vida media de solamente 6 días. IgA tienen tres funciones efectoras. Se une a

un receptor específico de IgA en macrófagos y eosinófilos, que conduce la fagocitosis y desgranulación, respectivamente. También puede fijar complemento a través de una vía alternativa desconocida.

- 5 La IgM se expresa como un pentámero o un hexámero, que se mantienen Unidas por una cadena J. IgM tiene vida media sérica de 5 días. Se une débilmente a C1q a través de un sitio de enlace ubicado en su dominio CH3. IgM tiene vida media de 3 días en suero. No está claro qué funciones efectoras son atribuibles a Ig. IgE es una Ig monomérica y tiene una vida media sérica de 2,5 días. IgE se une a los receptores Fc que conducen la desgranulación y da como resultado la liberación de agentes proinflamatorios.
- 10 Dependiendo del efecto *in vivo* deseado, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isótipos descritos anteriormente o pueden contener regiones Fc mutadas en donde el complemento o las funciones del receptor de Fc se han alterado. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener toda la porción Fc de una inmunoglobulina, fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina o sus análogos fusionados a un compuesto interferón beta.
- 15 15 Las proteínas de fusión de la presente invención pueden consistir en proteínas de cadena sencillas o como polipéptidos de múltiples cadenas. Dos o más proteínas de fusión Fc se pueden producir de modo que interactúan a través de enlaces disulfuro que naturalmente se forman entre regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con respecto al compuesto interferón beta o pueden contener diferentes compuestos interferón beta fusionados en el extremo amino terminal de la porción Fc de la proteína de fusión.
- 20 20 Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc o similar a Fc puede servir para prolongar la vida media plasma *in vivo* del compuesto interferón beta fusionado en el extremo amino terminal. Además, el componente interferón beta de un compuesto de proteína de fusión debe retener al menos una actividad biológica del interferón beta. Un aumento en la vida media terapéutica o circulante se puede demostrar utilizando el método descrito en el presente documento o conocido en la técnica, en donde la vida media de la proteína de fusión se compara con la vida media del compuesto interferón beta solo. La actividad biológica se puede determinar a través de métodos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica.
- 25 30 Debido a que la región Fc de IgG producida por proteólisis tiene la misma vida media *in vivo* que la molécula de IgG intacta y los fragmentos Fab se degradan rápidamente, se cree que la secuencia relevante para prolongar la vida media se encuentra en los dominios CH2 y/o CH3. Además, se ha demostrado en la bibliografía que las tasas catabólicas de las variantes de IgG que no unen el receptor de Fc de alta afinidad o Clq son distinguibles de la tasa de supresión del anticuerpo natural, lo que indica que el sitio catabólico es diferente de los sitios implicados en la 35 unión del receptor de Fc o Clq. [Wawrzynczak y col., (1992) Molecular Immunology 29:221]. Los estudios de mutagénesis de sitio dirigido que utilizan una región Fc de IgGl murina sugirieron que el sitio de la región Fc de IgGl que controla la tasa catabólica se ubica en la interfaz del dominio CH2-CH3. Las regiones Fc se pueden modificar en el sitio catabólico para optimizar la vida media de las proteínas de fusión. La región Fc utilizada para las proteínas de fusión de la presente invención se puede derivar de una IgGl o una región Fc de IgG4 y puede contener las regiones de 40 CH2 y CH3, incluso la región bisagra.

Proteínas de fusión de albúmina heterólogas

- 45 45 La relaxina descrita en el presente documento se puede fusionar directamente o a través de un enlazador peptídico, polímero soluble en agua o enlazador profármaco a la albúmina o un análogo, fragmento o derivado de los mismos. Generalmente, las proteínas de albúmina que son parte de las proteínas de fusión de la presente invención se pueden derivar de la albúmina clonada de cualquier especie, incluso humana. La albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) consiste en una cadena única de polipéptido single no glucosilado de 585 aminoácidos con un peso molecular de la fórmula de 66.500. La secuencia de aminoácidos de la HSA humana se conoce [véase Meloun, y col. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, y col. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, y col. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747]. Se han descrito Diversas variantes polimórficas así como análogos y fragmentos de albúmina. [Véase Weitkamp, y col., (1973) Ann. Hum. Genet. 37:219]. Por ejemplo, en EP 322.094, varias formas más cortas de HSA. Algunos de estos fragmentos de HSA se describen, incluyendo HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369), y HSA(1-419) y los fragmentos entre 1-369 y entre 1-419. EP 399.666 describe fragmentos de albúmina que incluyen HSA(1-177) y HSA(1-200) y los fragmentos entre HSA(1-177) y HSA(1-200).

- 50 60 Se entiende que las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención incluyen compuestos de relaxina que se acoplan a cualquier proteína de albúmina, incluyendo fragmentos, análogos y derivados en donde la proteína de fusión es biológicamente activa y tienen una vida media plasma más larga que el compuesto de relaxina solo. Por lo tanto, la porción de albúmina de la proteína de fusión no necesita tener una vida media plasma igual a la de la albúmina humana natural. Los fragmentos, análogos y derivados se conocen o se pueden generar que tengan vidas medias más largas o tengan vidas medias intermedias a la de la albúmina humana natural y el compuesto de relaxina de interés.

- 65 65 Las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención abarcan proteínas que tienen sustituciones de

5 aminoácidos conservativas en el compuesto de relaxina o la porción Fc de albúmina de la proteína de fusión. Una "sustitución conservativa" es el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tienen la misma carga electrónica neta y aproximadamente el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos alifáticas o alifáticas sustituidas tienen aproximadamente el mismo tamaño y el número total de carbono y heteroátomos en sus cadenas laterales difieren por no más que aproximadamente cuatro. Tienen 10 aproximadamente la misma forma cuando el número de ramas en sus cadenas laterales difiere por no más que una. Se considera que los aminoácidos con grupos fenilo o fenilo sustituido en sus cadenas laterales tienen 15 aproximadamente el mismo tamaño y forma. Excepto que se disponga expresamente lo contrario en el presente documento, las sustituciones conservativas preferentemente se hacen con aminoácidos naturales.

10 Las proteínas de albúmina e inmunoglobulina de tipo silvestre se pueden obtener de diversas fuentes. Por ejemplo, estas proteínas se pueden obtener de una biblioteca de ADNc preparada a partir de un tejido o células que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Las bibliotecas se pueden explorar con sondas diseñadas que utilizan la secuencia de proteínas o ADN publicada para la proteína particular de interés. Por ejemplo, las regiones constantes 15 de las cadenas ligera o pesada de inmunoglobulina se describen en Adams, y col. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, y col. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, y col. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77:6027-6031; Rice y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 79:7862-7862; Falkner, y col. (1982) *Nature* 298:286-288; y Morrison, y col. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Algunas referencias que describen las secuencias de ADN y 20 proteínas de albúmina incluyen Meloun, y col. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, y col. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, y col. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; y Minghetti, y col. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747.

Caracterización de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención

25 Existen varios métodos para caracterizar las proteínas de fusión de la presente invención. Algunos de estos métodos incluyen, pero no se limitan a: SDS-PAGE acoplado con método de tinción de proteínas o inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-IgG o anti-HSA. Otros métodos incluyen desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas (MALDI-MS, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida/espectrometría de masas, centrado isoeléctrico, intercambio aniónico analítico, cromatocentrado y dicroísmo circular, por ejemplo.

Potenciación de la afinidad para la albúmina sérica

30 También se pueden fusionar diversas moléculas con los polipéptidos de relaxina de la invención para modular la vida media de los polipéptidos de relaxina en suero. En algunas realizaciones, las moléculas se enlazan o fusionan 35 con polipéptidos de relaxina de la invención para potenciar la afinidad para la albúmina sérica endógena en un animal.

35 Por ejemplo, en algunos casos, se realiza una fusión recombinante de un polipéptido de relaxina y una secuencia de unión a albúmina. Las secuencias de unión a albúmina a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica (véase, por ejemplo, Makrides y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 40 277:534-542 (1996) y Sjolander y col., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)), o péptidos de unión a albúmina tales como los descritos en, por ejemplo, Dennis, y col., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002).

40 En otras realizaciones, los polipéptidos de relaxina de la presente invención se acilan con ácidos grasos. En algunos casos, los ácidos grasos promueven la unión con albúmina sérica. Véase, por ejemplo, Kurtzhals, y col., *Biochem. J.* 45 312:725-731 (1995).

45 En otras realizaciones, los polipéptidos de relaxina de la invención se fusionan directamente con albúmina de suero (incluyendo, pero no limitado a, albúmina sérica humana). Los expertos en la materia reconocerán que se pueden 50 unir también otras moléculas con relaxina en la presente invención para modular la unión a albúmina sérica u otros componentes del suero.

Glucosilación de polipéptidos de relaxina

55 La invención incluye polipéptidos de relaxina que incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural que portan restos de sacáridos. Los restos de sacáridos pueden ser naturales (incluyendo, pero no limitado a, N-acetilglucosamina) o no naturales (incluyendo, pero no limitado a, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos también se pueden enlazar a los aminoácidos codificados de modo no natural por un enlace glucosídico ligado a N u O (incluyendo, pero no limitado a, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (incluyendo, pero no limitado a, una oxima o el glucósido correspondiente unido a C o S).

60 Las fracciones de sacárido (incluyendo, pero no limitado a, glucosilo) se pueden añadir a polipéptidos de relaxina *in vivo* o *in vitro*. En algunas de las realizaciones de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene carbonilo se modifica con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxi para generar el polipéptido glucosilado correspondiente mediante un enlace de oxíma. Una vez unido al aminoácido codificado de modo no natural, el sacárido se puede elaborar adicionalmente por tratamiento 65 con glucosiltransferasas y otras enzimas para generar un oligosacárido unido al polipéptido de relaxina. Véase, por

ejemplo, H. Liu, y col. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene carbonilo se modifica directamente con un glicano con estructura definida preparado como un derivado de aminooxi. El experto en la materia reconocerá que se pueden utilizar otras funcionalidades, incluyendo azida, alquino, hidrazida, hidrazina y semicarbazida para unir el sacárido con el aminoácido codificado de modo no natural.

En algunas realizaciones de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene azida o alquinilo se puede modificar después, incluyendo, pero no limitado a, por una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2], incluyendo, pero no limitado a, con derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Este método permite que las proteínas se modifiquen con selectividad extremadamente alta.

Dímeros y multímetros de relaxina

La presente invención también proporciona combinaciones de relaxina y análogos de relaxina, tales como homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrámeros, etc.) en donde la relaxina que contiene uno o más aminoácidos codificados de modo no natural se une a otra relaxina o variante de relaxina del mismo o cualquier otro polipéptido que no sea relaxina o variante de relaxina del mismo, directamente a la estructura de polipéptidos o mediante un enlazador. Debido a su peso molecular aumentado en comparación con los monómeros, los conjugados de dímero o multímero de relaxina pueden mostrar propiedades nuevas o deseables, incluyendo, pero no limitado a, diferente vida media terapéutica farmacológica, farmacocinética, farmacodinámica, modulada o vida media en plasma modulada en relación con la relaxina monomérica. Para conocer ejemplos de análogos de relaxina monomérica véase, por ejemplo, Balschmidt, P., y col., patente de EE.UU. N.º 5.164.366, emitida el 17 de noviembre de 1992; Brange, J., y col., patente de EE.UU. N.º 5.618.913, emitida el 8 de abril de 1997; Chance, R. E., y col., patente de EE.UU. N.º 5.514.646, emitida el 7 de mayo de 1996; y Ertl, J., y col., EPO número de publicación 885.961, 23 de diciembre de 1998. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan análogos de relaxina monomérica que contienen uno o más restos de aminoácidos codificados de modo no natural y en algunas realizaciones estos incluyen análogos de relaxina monomérica en donde la posición B28 es Asp, Lys, lie, Leu, Val o Ala y el resto de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro; análogo de relaxina monomérica con Lys(B28)Pro(B29)-relaxina humana; análogo de relaxina monomérica Asp(B28)-relaxina humana; y análogo de relaxina monomérica Lys(B3)Ile(B28)-relaxina humana. En algunas realizaciones, los dímeros de relaxina de la invención modularán la transducción de señales del receptor de relaxina. En otras realizaciones, los dímeros o multímeros de relaxina de la presente invención actuarán como un antagonista, agonista o modulador del receptor de relaxina.

En algunas realizaciones, una o más de las moléculas de relaxina presentes en un dímero o multímero que contiene relaxina comprenden un aminoácido codificado de modo no natural enlazado a un polímero soluble en agua.

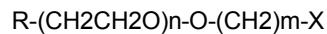
En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina se unen directamente, incluyendo, pero no limitado a, mediante un enlace de amida Asn-Lys o enlace disulfuro Cys-Cys. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina, o la molécula unida no relaxina, comprenderán diferentes aminoácidos codificados de modo no natural para facilitar la dimerización, incluyendo, pero no limitado a, un alquino en un aminoácido codificado de modo no natural de un primer polipéptido de relaxina y una azida en un segundo aminoácido codificado de modo no natural de una segunda molécula se conjugará mediante una cicloadición de Huisgen [3+2]. Alternativamente, la relaxina, o la molécula unida no relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona se puede conjugar con un segundo polipéptido que comprenda un aminoácido codificado de modo no natural que contiene hidroxilamina y se hace reaccionar a los polipéptidos mediante formación de la oxima correspondiente.

Alternativamente, los dos polipéptidos de relaxina y/o la molécula unida distinta de relaxina, se unen mediante un enlazador. Se puede utilizar cualquier enlazador hetero u homobifuncional para enlazar las dos moléculas, y/o las moléculas unidas distintas de relaxina, que pueden tener la misma o diferentes secuencias primarias. En algunos casos, el enlazador utilizado para ligar la relaxina y/o las moléculas unidas distintas de relaxina entre sí puede ser un reactivo de PEG bifuncional. El enlazador puede tener un amplio intervalo de peso molecular o longitud molecular. Se pueden utilizar enlazadores de peso molecular mayor o menor para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre la relaxina y la entidad unida o entre relaxina y su receptor, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera. También se pueden utilizar enlazadores que tienen longitud molecular más larga o más corta para proporcionar un espacio o flexibilidad deseados entre la relaxina y la entidad unida, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera.

En algunas realizaciones, la invención proporciona enlazadores bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura en forma de mancuerna que incluyen: a) una porción que contiene azida, alquino, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura polimérica; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la estructura polimérica. El segundo grupo funcional puede ser el mismo o diferente del primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional. La invención proporciona, en algunas realizaciones, compuestos solubles en agua que

comprenden al menos una rama de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede ser dendrítica.

En algunas realizaciones, la invención proporciona multímeros que comprenden uno o más polipéptidos de relaxina, 5 formados por reacciones con polímeros activados solubles en agua que tienen la estructura:



en donde n es de aproximadamente 5 a 3.000, m es 2-10, X puede ser un grupo azida, alquino, hidrazina, hidrazida, 10 aminooxi, una porción que contiene hidroxilamina, acetilo o carbonilo y R es un grupo protector, un grupo funcional o un grupo saliente que puede ser el mismo o diferente que X. R puede ser, por ejemplo, un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxi, éster N-hidroxisuccinimidilo, éster de 1-benzotriazolilo, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo, carbonato de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, 15 vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glixoxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno y cetona.

Medición de la actividad del polipéptido de relaxina y la afinidad del polipéptido de relaxina con el receptor de relaxina

La actividad del polipéptido de relaxina se puede determinar utilizando ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales o conocidos. Los polipéptidos de relaxina se pueden analizar para conocer la actividad biológica a través de método 20 adecuados conocidos en la técnica. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, la activación de genes que responden a interferón, ensayos de unión al receptor, ensayos de actividad antivírica, ensayos de inhibición del efecto citopático, (Familletti y col., Meth. Enzymol. 78:387-394), ensayos anti-proliferativos, (Aebersold y Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582), ensayos inmunomoduladores (patentes estadounidenses N.º 4.914.033; 4.753.795), y ensayos que controlan la inducción de moléculas MHC (por ejemplo, Hokland y col., Meth. Enzymol. 119:688-693), 25 como se describe en Meager, J. Immunol. Meth., 261:21-36 (2002).

La captación de glucosa en adipocitos 3T3-1 se puede evaluar utilizando el siguiente método. Se obtienen células 30 3T3-L1 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, Md.). Las células se cultivan en medio de crecimiento (GM, por sus siglas en inglés) que contiene suero bovino fetal enriquecido con hierro al 10 % en medio de Eagle modificado por Dulbecco. Para diferenciación de linfocitos convencional, 2 días después de que las células 35 alcanzaran la confluencia (denominado día 0), las células se exponen a medio de diferenciación (DM, por sus siglas en inglés) que contiene suero bovino fetal al 10 %, 10 µ/ml de relaxina, 1 µM de dexametasona y 0,5 µM de isobutilmetilxantina, durante 48 horas. Las células se mantienen después en medio postdiferenciación que contiene suero bovino fetal al 10 % y 10 µ/ml de relaxina. La potencia *in vitro* se puede medir con el ensayo de captación de glucosa que se conoce por los expertos en la materia. La potencia *in vitro* se puede definir como la medida de 40 captación de glucosa de un compuesto de relaxina en un ensayo basado en células y es una medida de la potencia biológica del compuesto de relaxina. Se puede expresar como la EC50 que es la concentración eficaz del compuesto que da como resultado 50 % de actividad en un experimento de respuesta a dosis sencilla.

Ensayo de Transporte de Glucosa-Dependiente de relaxina. La captación de Hexosa, como se ensayó por la 45 acumulación de 0,1 mM 2-desoxi-D-[14C]glucosa, se mide de la siguiente manera: se lavan adipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos dos veces con tampón KRP (136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM NaPO4, 0,9 mM CaCl2, 0,9 mM MgSO4, pH 7,4) calentado a 37 °C y que contiene BSA al 0,2 %, se incuban en medio L-15 de Leibovitz que contiene BSA al 0,2 % durante 2 horas a 37 °C en aire ambiente, se lavan dos veces nuevamente con tampón KRP que contiene BSA al 0,2 % y se incuban en tampón KRP, BSA al 0,2 % en ausencia (solamente Me2SO) o presencia 50 de wortmanina durante 30 minutos a 37 °C en aire ambiente. Despues se añade relaxina a una concentración final de 100 nM durante 15 minutos y se mide la captación de 2-desoxi-D-[14C]glucosa durante los últimos 4 minutos. Se resta la captación no específica, medida en presencia de citocalasina 10 µM citocalasina B, de todos los valores. Las concentraciones de proteínas se determinan con el ensayo de ácido bicíclico de Pierce. La captación se mide de forma rutinaria por triplicado o cuadruplicado para cada experimento. Puede investigarse el efecto del pretratamiento agudo y crónico de adipocitos 3T3-L1 con FGF-21 en presencia de relaxina.

Ensayo de Transporte de Glucosa-Independiente de relaxina. Se siembran fibroblastos 3T3-L1 en placas de 96 pocillos y se diferencian a células grasas (adipocitos) durante 2 semanas. Despues de la diferenciación se privan de alimento en medio sin suero y se tratan con varios polipéptidos de relaxina de la presente invención durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se lavan dos veces con tampón KRBH, que contiene BSA al 0,1 %. Se realiza 60 captación de glucosa en presencia de glucosa marcada en tampón KPBH. Esto permite la evaluación cualitativa de diversos polipéptidos de relaxina y análogos producidos a través de medios de la presente invención, y los que se han pegilado ya que se sabe que la pegilación provoca una disminución en la eficacia de la molécula natural, y compara la eficacia de diferentes insulinas. Adicionalmente, puede mostrarse que los polipéptidos de relaxina de la 65 presente invención inducen captación de glucosa en un modelo tisular *ex vivo*.

En el modelo de transporte de glucosa ex vivo, el ensayo de transporte de glucosa se describe como sigue: Soluciones Madre de Tampón de Krebs-Henseleit. Solución madre 1: NaCl (1,16 M); KCl (0,046 M); KH₂PO₄ (0,0116 M); NaHCO₃ (0,0253 M). Solución madre 2: CaCl₂ (0,025 M); MgSO₄ (2H₂O)(0,0116 M). BSA: Usar Porción V de Cohn de ICN, BSA sin ácidos grasos directamente sin dializar. Preparación de Medio: añadir 50 ml de

5 solución madre de Krebs de 1 a 395 ml de dH₂O y gas con O₂ al 95 %/CO₂ al 5 % durante 1 hora. Añadir 50 ml de solución madre 2 y llevar a 500 ml con dH₂O. Añadir 500 mg de BSA sin ácido graso ICN. Medios de preincubación e incubación: 32 mM manitol, 8 mM glucosa. Medio de lavado: 40 mM manitol, 2 mM piruvato. Medio de transporte: 39 mM manitol, 1 mM 2-DG; 32 mM manitol, 8 mM 3-O-MG. Solución de relaxina: (relaxina porcina [Lilly] 100.000.000 µU/ml) en una concentración final de 2000 µU/ml o 13,3 nM. Preparación de medio de marcaje radiactivo: actividades específicas usadas: 2DG=1,5 mCi/ml; 3-O-MG-437 µCi/ml; o manitol-8 µCi/m. Se anestesió a las ratas con 0,1 cc Nembutal por 100 g de peso corporal. Se escinde tejido muscular y se aclara en solución salina al 0,9 %, después se sitúa en medio de preincubación (2 ml) a 29 °C durante 1 hora. El tejido muscular se transfiere a medio de incubación (2 ml; igual que la preincubación excepto que incluye insulina o compuesto de ensayo) y se incuba durante 30 minutos (depende de las condiciones experimentales) El tejido muscular se transfiere después a medio de lavado (2 ml) durante 10 minutos a 29 °C, después se transfiere a medio de marcaje (1,5 ml) durante 10 minutos (3-O-MG) o 20 minutos (2DG). El tejido muscular se reduce, se pesa y se sitúa en tubos de polipropileno en hielo seco Se añade 1 ml de KOH 1 N a los tubos que se sitúan después en un baño de agua a 70 °C durante 10-15 minutos, agitando los tubos en vórtex cada pocos minutos Los tubos se enfrián en hielo y se añade 1 ml HCl 1 N, después se mezcla bien Se ponen después 200 µl de sobrenadante en viales de centelleo duplicados y se cuentan en un contador de centelleo en comparación con patrones radiactivos conocidos.

Para la contracción, los músculos se incuban primero durante 1 hora en medio de preincubación/incubación. Despues de 1 hora, se sujeta un músculo de cada par (un par por rata) en el aparato de estimulación y el otro músculo se transfiere a un nuevo matraz de medio de incubación. El músculo contraído se estimula por series de 200 milisegundos de 70 Hz siendo cada impulso en una serie de 0,1 milisegundos Las series se suministran a 1/s a 10-15 V durante 2 x 10 minutos con un descanso de 1 minuto entre medio. Al final del periodo de estimulación, el músculo se retira del aparato de estimulación y se sitúa en medio de lavado durante 10 minutos, seguido de medio de marcaje como se ha perfilado anteriormente.

30 Las cantidades de relaxina promedio, polipéptidos de relaxina y/o análogos de relaxina de la presente invención pueden variar y en particular se deben basar en las recomendaciones y prescripción de un médico calificado. La cantidad de relaxina exacta, polipéptidos de relaxina o análogos de relaxina de la presente invención es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto o gravedad de la afección que se trata, la condición del paciente que se trata así como los otros ingredientes en la composición. La invención también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. La cantidad que se administrará puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia basándose en la terapia con relaxina, terapias con relaxina disponibles u otros análogos de relaxina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de una manera convencional.

40 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no limitan la invención reivindicada.

45 Ejemplo 1

Este ejemplo describe uno de los varios posibles conjuntos de criterios para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos codificados de modo no natural en la relaxina.

50 Las Figuras 1-4 muestran la estructura y la secuencia de relaxina y la tabla a continuación incluye secuencias con la cadena A, cadena B, relaxina y prorrelaxina. Se generaron polipéptidos de relaxina mediante la sustitución de un aminoácido codificado natural por un aminoácido codificado de modo no natural. Se sustituyó en cada polipéptido uno de los aminoácidos por para-acetil fenilalanina (pAcF o pAF). Los polipéptidos generados carecían de la secuencia líder y eran polipéptidos de relaxina de cadena A/B (SEQ ID NO: 1-3). Cada uno de los polipéptidos generados tenía una sustitución de aminoácido codificado de modo no natural en una de las siguientes posiciones 1, 5, 18, 13, 2 de SEQ ID NO: 4 o en esas posiciones de la cadena A de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas o 5, 7, 18, 28 de SEQ ID NO: 5 o 6 en esas mismas posiciones de la cadena B de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas. La Figura 2 muestra la estructura de la relaxina humana que se marcó utilizando el software PyMOL (DeLano Scientific; Palo Alto, CA) y algunos aminoácidos correspondientes a los sustituidos por para-acetil fenilalanina en los polipéptidos de relaxina de la invención.

65 Otro conjunto de criterios para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos codificados de modo no natural incluye utilizar y comparar las estructuras cristalinas del Protein Data Bank, o de otros bancos de datos, que se utilizan para modelar la estructura de la relaxina y se identifican restos que 1) no interferirían con la unión al receptor y 2) no estarían presentes en el interior de la proteína. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural, pero no se limita a, en una o más de las siguientes posiciones en la

relaxina: 1, 5, 18, 13, 2 de SEQ ID NO: 4 o en esas posiciones de la cadena A de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas o 5, 7, 18, 28 de SEQ ID NO: 5 o 6 o en esas mismas posiciones de la cadena B de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas.

- 5 Se utilizaron los siguientes criterios para evaluar cada posición de la relaxina y de los análogos de relaxina para la introducción de un aminoácido codificado de modo no natural: el resto (a) no debería interferir con la unión del receptor según el análisis estructural, b) no debería verse afectado por la mutagénesis por barrido con alanina u homólogo (c) debería ser de superficie expuesta y presentar interacciones de enlace de hidrógeno o van der Waals mínimas con restos circundantes, (d) debería ser eliminado o variable en las variantes de relaxina, (e) provocaría cambios conservativos tras la sustitución por un aminoácido codificado de modo no natural (f) se podría encontrar en cualquiera de las regiones altamente flexibles o regiones estructuralmente rígidas. Además, se pueden realizar más cálculos sobre la molécula de relaxina utilizando el programa Cx (Pintar y col. (2002) Bioinformatics, 18, pp 980) para evaluar el grado de protrusión para cada átomo de la proteína.
- 10 15 En principio, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la cadena A de relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1-3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la cadena B de relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEQ ID NO: 5 o 6 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 1-3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). En algunos casos, se incorporan uno o más aminoácidos codificados de modo no natural en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3).
- 20 25 30 35

Ejemplo 2

Este ejemplo detalla la clonación y la expresión de un polipéptido de relaxina incluyendo un aminoácido codificado de modo no natural en *E. coli*.

40 Los métodos para clonar la relaxina se conocen por los expertos en la materia. Las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos para la relaxina y para clonar la relaxina en células hospedadoras se describen en la patente de EE.UU. N.º 4.758.516; la patente de EE.UU. N.º 5.166.191; la patente de EE.UU. N.º 5.179.195, 5.945.402; y 45 5.759.807.

El ADNc que codifica la relaxina se muestra como SEQ ID NO: 12 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se muestra como SEQ ID NO: 1.

TABLA 1: Secuencias de [e]xjna citadas

Un sistema de traducción introducido que comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) se utiliza para expresar la relaxina o análogos de relaxina que contienen un aminoácido codificado de modo no natural. La O-RS preferentemente aminoacila el O-ARNt con un aminoácido codificado de modo no natural. A su vez, el sistema de traducción inserta al aminoácido codificado de modo no natural en la relaxina o análogo de relaxina, en respuesta a un codón selector codificado. Se describen secuencias adecuadas de O-RS y O-ARNt en el documento WO 2006/068802 titulado "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9; SEQ ID NO: 16) y el documento WO 2007/021297 titulado "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEQ ID NO: 17).

10

TABLA 2: Secuencias citadas		
SEQ ID NO: 18	<i>M. jannaschii</i> ARNtm ^{Tyr} _{CUA}	ARNt
SEQ ID NO: 19	<i>HLAD03</i> ; un supresor ámbar optimizado ARNt	ARNt
SEQ ID NO: 20	<i>HL32SA</i> ; un supresor por cambio de marco AGGA optimizado ARNt	ARNt
SEQ ID NO: 21	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)</i>	RS
SEQ ID NO: 22	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina p-BpaRS(1)</i>	RS
SEQ ID NO: 23	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 24	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 25	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS</i>	RS
SEQ ID NO: 26	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(1)</i>	RS
SEQ ID NO: 27	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(3)</i>	RS
SEQ ID NO: 28	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)</i>	RS
SEQ ID NO: 29	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(2)</i>	RS
SEQ ID NO: 30	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW1)</i>	RS
SEQ ID NO: 31	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW5)</i>	RS
SEQ ID NO: 32	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW6)</i>	RS
SEQ ID NO: 33	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-5)</i>	RS
SEQ ID NO: 34	<i>Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-6)</i>	RS

15 La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen gen del análogo de relaxina o relaxina modificada y el par aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal/ARNt (específico para el aminoácido codificado de modo no natural deseado) permite la incorporación específica del sitio del aminoácido codificado de modo no natural en el polipéptido de relaxina.

20 Se amplifica la relaxina madura natural por PCR de una reacción de síntesis de ADNc utilizando los protocolos convencionales y se clona en pET30 (Ncol-BamHI). Antes o, alternativamente, después de la confirmación de la secuencia, la relaxina que incluye una secuencia HHHHHSGG N terminal se subclona en un vector de supresión que contiene un supresor ámbar tirosil ARNtTyr/CUA de *Methanococcus jannaschii* (Mj ARNtTyr/CUA) bajo control constitutivo de un promotor sintético derivado de la secuencia promotora de lipoproteína de *E. coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), así como la tirosil ortogonal-ARNt-sintetasa (MjTyrRS) bajo control del promotor GlnRS de *E. coli*. La expresión de la relaxina está bajo el control del promotor T7. Las mutaciones ámbar se introducen utilizando protocolos de mutación de cambio rápido convencionales (Stratagene; La Jolla, California). Se verifican las secuencias de las construcciones.

25 La evaluación de los compuestos de relaxina de acción prolongada se puede realizar utilizando el modelo de rata diabética STZ (PCO 08-400-209).

30 Supresión con para-acetil fenilalanina (pAcF)

35 Se utilizaron plásmidos (por ejemplo, pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381)) para transformar en la cepa W3110B57 de *Escherichia coli* para producir la cepa RLX-BA1-AV13pAFW3110B2 de *E. coli* en donde la expresión de la polimerasa T7 fue controlada por un promotor inducible por arabinosa. Se diluyeron los cultivos bacterianos producidos durante la noche 1:100 en matraces de agitación que contenían 2X medio de cultivo YT y se cultivaron a 37 °C a una DO₆₀₀ de ~0,8. Se indujo la expresión de la proteína por el añadido de arabinosa (0,2 % final) y para-acetil fenilalanina (pAcF) hasta una concentración final de 4 mM. Se incubaron los cultivos a 37 °C durante 5 horas. Se sedimentaron las células y se resuspendieron en tampón de lisis B-PER (Pierce) 100 ul/DO/ml + 10 ug/ml DNasa

5 y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se extrajo el material celular por centrifugación y se extrajo el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en una cantidad igual de tampón de carga de proteína SDS-PAGE. Se cargaron todas las muestras en un gel PAGE 4-12 % con MES y DTT. Los métodos para purificar la relaxina son conocidos por los expertos en la materia y se confirmaron por SDS-PAGE, análisis de transferencia Western o espectrometría de masas de barrera iónica de ionización por electropulverización y similares.

10 Las proteínas de relaxina mutantes marcadas con His se pueden purificar utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. Se puede utilizar la Nickel-Chelating Resin ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) a través de los procesos convencionales de purificación de proteínas marcadas con His proporcionados por el fabricante. Las mediciones funcionales de las proteínas se pueden realizar a través de métodos conocidos en la técnica, los métodos proporcionados por la presente invención y las referencias incorporadas, y alternativamente se puede desarrollar un ELISA sobre células vivas para evaluar los polipéptidos de relaxina de la invención.

TABLA 3: Análisis de variantes de relaxina

Lote/Descripción	SDS-PAGE	LAL (EU/mg)	onc. a A280	Pureza RP-HPLC	Pureza SE-HPLC
Relaxina WT ³	Banda principal NR migra cerca del patrón 6 kDa MW	NT	2,4	91,2 %	NT
20K Q1pAF ^{1,3,4} PEGilado		7,7	3,4	100 %	NT
20K A5pAF ^{1,3,4} PEGilado		3,6	2,4	100 %	NT
20K R18pAF ^{1,3,4} PEGilado		16,1	2,4	100 %	NT
20K E5pAF ^{2,3} PEGilado		NT	0,6	99,8 %	NT
20K V7pAF ^{2,3,4} PEGilado		10,5	2,3	99,4 %	NT
20K PEGilado A18pAF ^{2,3}		NT	2,0	99,0 %	NT
20K W28pAF ^{2,3,4} PEGilado		9,1	2,2	99,4 %	NT
20K V13pAF ^{1,3,4} PEGilado		5,1	3,7	99,5 %	NT
20K E5pAF ² PEGilado		NT	0,6	99,6 %	NT
20K L2pAF ¹ PEGilado		0,0	1,6	99,5 %	NT
Relaxina WT ³		0,1	2,5	85,6 %	NT
20K Q1pAF ^{1,3} PEGilado	Banda principal NR migra entre los patrones 49 y 38 kDa MW	<0,4	2,3	99,3 %	99,3 %
5K V13pAF ^{1,3} PEGilado	Banda principal NR migra cerca del patrón 14 kDa MW	5,4	1,5	99,4 %	99,8 %
10K V13pAF ^{1,3} PEGilado	Banda principal NR migra entre los patrones 28 y 17 kDa MW	9,8	1,8	99,4 %	99,5 %
20K V13pAF ^{1,3} PEGilado	Banda principal NR migra entre los patrones 49 y 38 kDa MW	4,7	1,9	99,0 %	99,5 %
30K V13Paf ^{1,3} PEGilado	Banda principal NR migra entre los patrones 62 y 49 kDa MW	8,0	2,1	99,5 %	99,8 %

Muestras no reducidas (NR); NT = no evaluado

¹ sustitución pAcF ubicada en cadena A

² sustitución pAcF ubicada en cadena B

³ sustitución Asp a Ala en cadena B (BA1)

⁴ utilizado para PK inicial

TABLA 4: Pérdida de actividad de variante de relaxina

Variante	Pérdida en veces de actividad <i>in vitro</i>	Tamaño de PEG	Term PK <i>in vivo</i> HL (h)	Farm. <i>in vivo</i>	Matraz de agitación	Titulación de fermentador (pasta de células)	Caracterización analítica
RLX-A-AV13	17	5K, 10K, 20K, 30K	2,6(5K), 8,7(10K), 13,8(20K), 26,8(30K)		sí	1 gm/l	SDS-PAGE, conc., LAL, RP-HPLC, SE- HPLC

(continuación)

Variante	Pérdida en veces de actividad in vitro	Tamaño de PEG	Term PK in vivo HL (h)	Farm. in vivo	Matraz de agitación	Titulación de fermentador (pasta de células)	Caracterización analítica
RLX-A-AQ1	12	20K	10,7	20K muestra eficacia	sí	720 mg/l	SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL, SE- HPLC
RLX-A-AA5	12	20K	12,2		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A-BV7	15	20K	13,1		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A-AL2	17	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BE5	17	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-AR18	21	20K	12,5		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-BE5	22	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BA18	48	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BW28	48	20K	13,9		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL

Ejemplo 3

5 Este ejemplo detalla la expresión de los polipéptidos de prorrelaxina por *E. coli*.

10 *E. coli* expresó prorrelaxina como una proteína de cadena única compuesta por 88 aminoácidos. Tras la digestión con tripsina y carboxipeptidasa, se retiran un péptido conector y una secuencia líder. El péptido resultante es un péptido de cadena doble pequeño de 6 kDa miembro de la superfamilia de insulina que consiste en una cadena A de 24 restos y una cadena B de 29 restos. El pliegue estructural se caracteriza por dos cadenas peptídicas que se mantienen juntas por dos enlaces disulfuro intercadena (Cys11-Cys36 y Cys24-Cys48) y unos enlaces disulfuro intracadena (Cys10-Cys15). La estructura terciaria basada en una estructura cristalina de relaxina-2 humana reveló un pliegue compacto que comprende tres segmentos helicoidales y una región extendida corta que comprende un núcleo hidrofóbico.

15 15 La relaxina con uno o más aminoácido o aminoácidos codificados de modo no natural proporciona una química única y permite una variante recombinante PEGilada específica que contiene un grupo carbonilo incorporado biosintéticamente, químicamente reactivo, mediante el reemplazo de un aminoácido natural con para-acetil fenilalanina (pAcF), lo que proporciona un único sitio de unión covalente para un poli(etilen)glicol (PEG).

Ejemplo 4

20 Este ejemplo detalla la expresión de los polipéptidos de prorrelaxina por *E. coli*.

25 Este ejemplo describe el escalamiento ascendente de la producción de polipéptidos de relaxina utilizando un fermentador de cinco (5) litros. Estos métodos y el escalamiento ascendente también se pueden utilizar para lotes de 10 l, 30 l, 150 l y 1000 l. En algunas realizaciones de la presente invención, se producen al menos 2 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 4 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 6 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 8 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 10 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 15 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 20 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular.

35 35 2.1 Matraces de agitación y siembra

40 40 Se utilizó la cepa W3110B57 de *Escherichia coli* [F-IN(rrnD-rrnE) lambda-araB::gl tetA fhuA::dhfr ompT::cat] que alberga al plásmido pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381) para producir RLX-BA1-AV13pAF. Se extrajo un único frasco de banco celular de investigación (RCB) de -80 °C y se descongeló a temperatura ambiente, después se utilizaron 50 µl para inocular 50 µl de medio de siembra (un medio químicamente definido) complementado con

50 µg/ml sulfato de kanamicina en un matraz de Erlenmeyer inclinado de 250 ml. Se cultivó el cultivo de siembra primario durante aproximadamente 18 horas a 37 °C y 250 rpm (perno de 1 pulgada). Se subcultivó el cultivo de siembra primario en un cultivo de siembra secundario a una densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (DO600) de 0,05 en un matraz de Erlenmeyer inclinado de 500 ml que contenía 100 ml de medio de siembra complementado con 50 µg/ml sulfato de kanamicina. Se cultivó el cultivo de siembra secundario a 37 °C y 250 rpm (perno de 1 pulgada) durante aproximadamente 8 horas o cuando la DO600 llegó a entre 2 y 4.

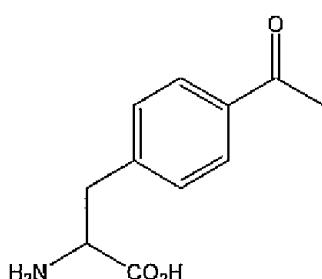
2.2 Fermentadores

- 10 Se llenaron recipientes de 5 l Sartorius Biostat B con 2,1 l de medio de producción (un medio químicamente definido) complementado con 50 µg/l de sulfato de kanamicina. Los cultivos de siembra secundarios se utilizaron para inocular los fermentadores a una DO600 inicial de 0,035. Se cultivaron los cultivos a 37 °C y el oxígeno disuelto se fijó para mantener el 30 % (saturación de aire) con una cascada de agitación primaria (480 - 1200 rpm) y una cascada secundaria de O₂. Un caudal de aire de 5 LPM con contrapresión de 6 psi se mantuvo durante la fermentación. El pH del cultivo se fijó en 7,2 ± 0,05 con el añadido de hidróxido de amonio al 15 % y se añadió antiespumante Dow Chemical P2000 según fue necesario para el control de la espuma. Cuando el cultivo alcanzó una DO600 de entre 35 ± 5 (cuando casi se había agotado el glicerol inicial en el medio de cultivo discontinuo), se inició una alimentación por bolo de 200 ml y al mismo tiempo el punto de ajuste de pH se ajustó de 7,2 a 6,6. Despues de la alimentación por bolo inicial, se inició una alimentación continua a una tasa de 0,25 ml/l/min y se continuó hasta la cosecha. Inmediatamente después de iniciar la alimentación, se añadieron 2,5 ml/l (0,2 g/l volumen de cultivo final) de una solución dipeptídica de L-Ala-pAcF 100 g/l preparada en agua al fermentador. Quince minutos después del añadido del dipéptido, se indujo el cultivo mediante el añadido de L-arabinosa (receta proporcionada en PTR-FGF-002) a una concentración de 2 g/l (volumen de cultivo final). Se cultivó el cultivo durante 6 horas después del añadido de arabinosa y se cosechó.
- 15
- 20
- 25
- 30 La Figura 5 muestra un gel de SDS-PAGE de la prorrelaxina producida mediante estos métodos con un aminoácido de la cadena B1 como Ala y una para-acetil fenilalanina en la 13^a posición de aminoácido de la cadena A, sustituido con valina.

30 Ejemplo 5

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

- 35 Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 5.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11) y cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:
- 40
- 45



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-acetil fenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 1 y 2 (cadenas A y B de relaxina) y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y 15, 29, 30 o 31 (TyrRS LW1, 5 o 6) descritas en el Ejemplo 2 anterior.

- 50 Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:



en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 5.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma

Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 10 a 100 veces de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

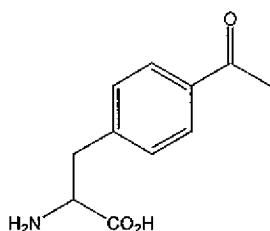
5

Ejemplo 6

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

10

Este Ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 20.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:

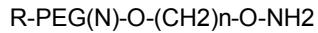


20

Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 4 y 5 o 6 (cadenas A y B de relaxina) y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

25

Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:



30

en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 20.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

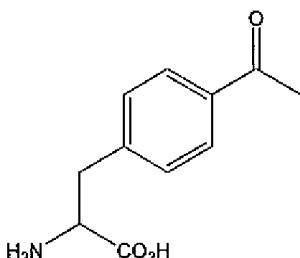
35

Ejemplo 7

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

40

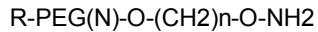
Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 20.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:



50

Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:

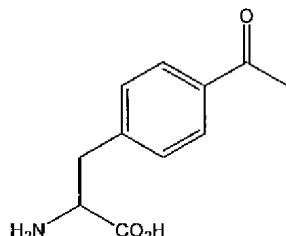


en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 20.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 8

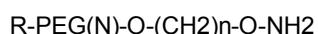
Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

Este Ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 20.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:



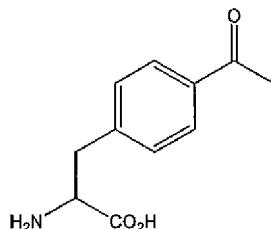
en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 20.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. A. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 9

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

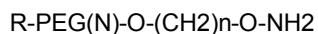
Este Ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 30.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 2 o 3) y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

10 Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un derivado de PEG que contiene aminooxi de forma:

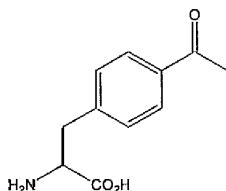


20 en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 30.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 10

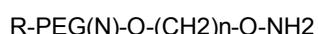
25 Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

30 Este Ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 40.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:



40 Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 13 (o SEQ ID NO: 1, 2 o 14) y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

45 Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:

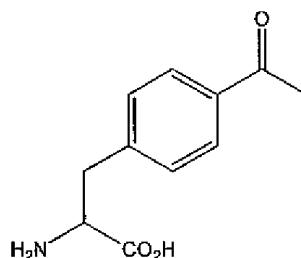


50 en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 40.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 11

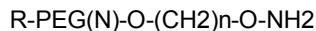
Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene carbonilo y la posterior reacción con un PEG que contiene aminooxi.

Este Ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi de aproximadamente 10.000 MW. Cada uno de los restos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado de modo no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID NO: 13 (o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 1, 2 o 14) y SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNntmut, *M. jannaschii*) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:

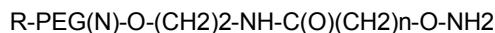


en donde R es metilo, n es 3 y N es aproximadamente 10.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxi y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 12

Conjugación con un PEG que consiste en un grupo hidroxilamina unido al PEG a través de un enlace amida.

Un reactivo de PEG que tiene la siguiente estructura está acoplado a un aminoácido codificado de modo no natural que contiene cetona utilizando el procedimiento descrito en los Ejemplos 3-9:



en donde R = metilo, n=4 y N es aproximadamente 5.000 MW - 40.000 MW. Las condiciones de reacción, purificación y análisis son como se describió y como se conoce en la técnica.

Ejemplo 13

Este ejemplo detalla la introducción de dos aminoácidos codificados de modo no natural diferentes en polipéptidos de relaxina y polipéptidos de análogo de relaxina.

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado de modo no natural que comprende una funcionalidad cetona en dos posiciones entre los siguientes restos: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3). El polipéptido de relaxina se prepara como se describió anteriormente, con la diferencia de que el codón selector se introduce en dos sitios diferentes dentro del ácido nucleico.

Ejemplo 14

Este ejemplo detalla la conjugación del polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina con un PEG que contiene hidrazida y reducción *in situ* posterior.

5 Un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo se prepara de acuerdo con el procedimiento que se describió anteriormente. Una vez modificado, un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura se conjuga con un polipéptido de relaxina:

10 R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-X-NH-NH₂

en donde R = metilo, n=2 y N = 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; o 40.000 MW y X es un grupo carbonilo (C=O). La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina se disuelve a entre 0,1-10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 1 a 100 veces de PEG que contiene hidrazida, y la hidrazone correspondiente se reduce *in situ* mediante el añadido de solución madre 1M NaCNBH₃ (Sigma Chemical, St. Louis, MO), se disuelve en H₂O hasta una concentración final de 10-50 mM. Las reacciones se realizan en la oscuridad a 4 °C a RT durante 18-24 horas. Se detienen las reacciones mediante el añadido de 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris de 50 mM o se diluye en tampón adecuado para la purificación inmediata.

Ejemplo 15

25 Este ejemplo detalla la conjugación del polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina con un PEG que contiene hidrazida y reducción *in situ* posterior.

Un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo se prepara de acuerdo con el proceso que se describió anteriormente. Una vez modificado, un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura se conjuga con un polipéptido de relaxina:

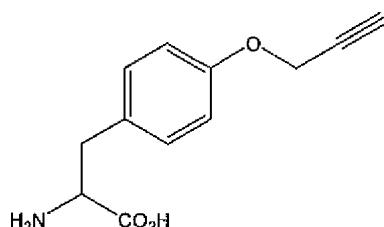
30 R-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-X-NH-NH₂

en donde R = metilo, n=2 y N = 20.000 MW y X es un grupo carbonilo (C=O). La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina se disuelve a entre 0,1-10 mg/ml en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de 1 a 100 veces de PEG que contiene hidrazida, y la hidrazone correspondiente se reduce *in situ* mediante el añadido de solución madre 1M NaCNBH₃ (Sigma Chemical, St. Louis, MO), se disuelve en H₂O hasta una concentración final de 10-50 mM. Las reacciones se realizan en la oscuridad a 4 °C a RT durante 18-24 horas. Se detienen las reacciones mediante el añadido de 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris de 50 mM o se diluye en tampón adecuado para la purificación inmediata.

Ejemplo 16

45 Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene alquino en un polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina y la derivación con mPEG-azida.

50 Los siguientes restos, antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituyen cada uno por el siguiente aminoácido codificado de modo no natural:



55 Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-propargil-tirosina en la relaxina son SEQ ID NO: 1 (o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 o 3), SEQ ID NO: 16 o 17 (ARNtmut, *M. jannaschii*) y 22, 23 o 24 descritas anteriormente. El polipéptido de relaxina que contiene la propargil tiroxina se expresa en *E. coli* y se purifica utilizando las condiciones descritas anteriormente.

La relaxina purificada que contiene propargil-tirosina se disuelve a entre 0,1-10 mg/ml en tampón PB (100 mM fosfato de sodio, 0,15 M NaCl, pH = 8) y se añade un exceso de 10 a 1000 veces de un PEG que contiene azida a la mezcla de reacción. Después, se añaden una cantidad catalítica de CuSO₄ y alambre de Cu a la mezcla de reacción. Después de incubar la mezcla (incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente o 37 °C, o durante la noche a 4 °C), se añade H₂O y se filtra la mezcla a través de una membrana de diáisisis. Se puede analizar la mezcla para la adición, incluyendo, pero no limitado a, mediante procesos similares descritos en el ejemplo 3. En este ejemplo, el PEG tendrá la siguiente estructura:

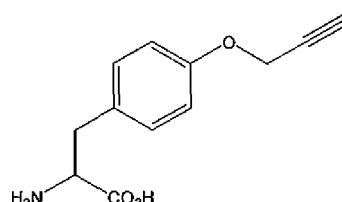
R-PLG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)(CH₂)_n-N₃

en donde R es metilo, n es 4 y N = 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; o 40.000 MW.

Ejemplo 17

15 Este ejemplo detalla la sustitución de un aminoácido hidrófobo grande en un polipéptido de relaxina por propargil tirosina.

20 Un resto Phe, Trp o Tyr presente dentro de una de las siguientes regiones de la relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo N terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) se sustituye por el siguiente aminoácido codificado de modo no natural como se describió anteriormente:



25 Una vez modificada, se une un PEG a la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que

M. DEG(M)-C₆(CH₃)₆NO

y los procesos de acoplado seguirían los de los ejemplos anteriores. Esto generará una variante del polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que es aproximadamente isostérica con una de los aminoácidos hidrófobos naturales grandes y que está modificada con un derivado de PEG en un sitio diferente dentro del polipéptido.

Ejemplo 18

Este ejemplo detalla la generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina separado por uno o más enlazadores de PEG. Se pueden formar multímeros del polipéptido de relaxina entre las proinsulinas o entre los polipéptidos de relaxina de cadena A y B maduros de la invención.

La variante del polipéptido de relaxina que contiene alquino producida en el ejemplo anterior se hace reaccionar con un derivado de PEG bifuncional de forma:

45 N3-(CH₂)_n-C(O)-NH-(CH₂)₂-O-PEG(N)-O-(CH₂)₂-NH-C(O)-(CH₂)_n-N3

en donde n es 4 y el PEG tiene un MW promedio de aproximadamente 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar el homodímero del polipéptido de relaxina correspondiente en donde las dos moléculas de relaxina están separadas físicamente por PEG. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 19

55 Este ejemplo detalla la generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina separado por uno o más enlazadores de PEG. Se pueden formar multímeros del polipéptido de relaxina entre las cadenas A y otras cadenas A o cadenas B y otras cadenas B.

60 La variante del polipéptido de relaxina que contiene alquino producida en el ejemplo anterior se hace reaccionar con un derivado de PEG bifuncional de forma:

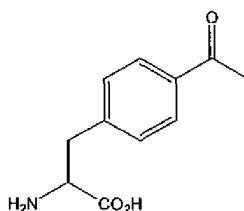


en donde n es 4 y el PEG tiene un MW promedio de aproximadamente 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar el homodímero del polipéptido de relaxina correspondiente en donde las dos moléculas de relaxina están separadas físicamente por PEG. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 20

Este ejemplo detalla el acoplamiento de una porción sacárida a un polipéptido de relaxina.

Un resto de los siguientes se sustituye por el aminoácido codificado de modo no natural a continuación: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID NO: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID NO: 2 y 3) como se describió anteriormente.

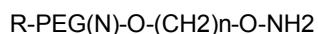


Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un análogo de N-acetilglucosamina unido a aminooxi por β (GlcNAc). Se mezclan la variante del polipéptido de relaxina (10 mg/ml) y el sacárido aminooxi (21 mM) en tampón acetato acuoso 100 mM (pH 5,5) y se incuban a 37 °C durante 7 a 26 horas. Un segundo sacárido se acopla enzimáticamente al primero mediante la incubación del polipéptido de relaxina conjugado con sacárido (5 mg/ml) con UDP-galactosa (16 mM) y β -1,4-galactosiltransferasa (0,4 unidades/ml) en 150 mM tampón HEPES (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente (Schanbacher y col. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

Ejemplo 22

Este ejemplo detalla la generación de un antagonista del polipéptido de relaxina PEGilado.

Se sustituye un resto, incluyendo, pero no limitado a, los que participan en la unión al receptor de relaxina por el siguiente aminoácido codificado de modo no natural como se describió anteriormente. Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hará reaccionar con un PEG que contiene aminooxi derivado de forma:



en donde R es metilo, n es 4 y N es 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar un antagonista del polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado de modo no natural que está modificado con un derivado de PEG en un único sitio dentro del polipéptido. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como se describió anteriormente.

Ejemplo 21

Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina en el cual las moléculas de relaxina están unidas directamente.

Se puede acoplar directamente una variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene alquino a otra variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene azido. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. En los Ejemplos 16 y 17 también se proporcionó una descripción de los multímeros que es posible formar y el acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como se describió anteriormente.

Ejemplo 22

- 5 Se hace reaccionar el polialquilenglicol (P-OH) con el haluro de alquilo (A) para formar el éter (B). En estos compuestos, n es un número entero de uno a nueve y R' puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo de C1 a C20, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada. R' también puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico de C3 a C7, saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un grupo alcarilo (el alquilo es un alquilo de C1 a C20 saturado o insaturado) o heteroalcarilo sustituido o no sustituido. normalmente, 10 PEG-OH es polietilenglicol (PEG) o monometoxi-polietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 800 a 40.000 Daltons (Da).

Ejemplo 23

Se trató mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). Se añadieron una solución de bromuro de propargilo, disuelta como una solución al 80 % en peso en xileno (0,56 ml, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich) y una cantidad catalítica de KI a la solución y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 2 horas. Se añadió agua (1 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al resto CH₂C₁₂ (25 ml) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH₂C₁₂ a éter dietílico (150 ml) por goteo. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de éter dietílico frío y se secó para obtener propargil-O-PEG.

Ejemplo 24

Se trató el mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml). Se añadieron a la mezcla cincuenta equivalentes de 5-bromo-1-pentina (0,53 ml, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI. Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 16 horas. Se añadió agua (1 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al resto CH₂C₁₂ (25 ml) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH₂C₁₂ a éter dietílico (150 ml) por goteo. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de éter dietílico frío y se secó para obtener el alquino correspondiente. Se puede utilizar 5-cloro-1-pentina en una reacción similar.

Ejemplo 25

- 40 (1) $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} + \text{NaOH} + \text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
 (2) $m\text{-HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{MsCl} + \text{N(Et)}_3 \rightarrow m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
 (3) $m\text{-MsOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} + \text{LiBr} \rightarrow m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$
 45 (4) $\text{mPEG-OH} + m\text{-Br-CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH} \rightarrow \text{mPEG-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$

A una solución de 3-hidroxibencil alcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml) se le añadió en primer lugar hidróxido de sodio en polvo (1,5 g, 37,5 mmol) y después una solución de bromuro de propargilo, disuelta como una solución al 80 % en peso en xileno (3,36 ml, 30 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas. A la mezcla se le añadió ácido cítrico al 10 % (2,5 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el resto con acetato de etilo (3x15 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para dar el alcohol 3-propargiloxibencílico.

55 Se añadieron cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH₂C₁₂ a 0 °C y se colocó la reacción en el refrigerador durante 16 horas. Un tratamiento final habitual proporcionó el mesilato como un aceite amarillo pálido. Se disolvió este aceite (2,4 g, 9,2 mmol) en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el resto con acetato de etilo (3x15 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

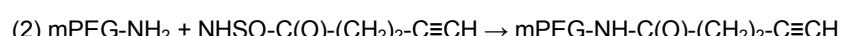
5 Se disolvió mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) en THF (20 ml) y se enfrió la solución en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) con agitación fuerte durante un período de varios minutos, seguido del añadido del bromuro obtenido anteriormente (2,55 g, 11,4 mmol) y una cantidad catalítica de KI. Se retiró el baño para enfriar y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al resto CH₂C₁₂ (25 ml) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. El añadido por goteo a una solución de éter (150 ml) produjo un precipitado blanco, que se recogió para dar el derivado de PEG.

10 Ejemplo 26



15 Los polímeros de polí(etylenglicol) que contienen alquino terminal también se pueden obtener acoplando un polímero de polí(etylenglicol) que contiene un grupo funcional terminal con una molécula reactiva que contiene la funcionalidad alquino como se mostró anteriormente. n es entre 1 y 10. R' puede ser H o un grupo alquilo pequeño de C1 a C4.

20 Ejemplo 27



25 Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g, 3,0 mmol) en CH₂C₁₂ (25 ml). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y se agitó la solución durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó el éster de NHS 7 bruto resultante en la siguiente reacción sin más purificación.

30 Se disolvió mPEG-NH₂ con un peso molecular de 5.000 Da (mPEG-NH₂, 1 g, Sunbio) en THF (50 ml) y se enfrió la mezcla a 4 °C. Se añadió éster de NHS 7 (400 mg, 0,4 mmol) en partes con agitación fuerte. Se dejó agitar la mezcla durante 3 horas mientras se llevó a temperatura ambiente. Se añadió agua (2 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al resto CH₂C₁₂ (50 ml) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. Se añadió esta solución de CH₂C₁₂ a éter (150 ml) por goteo. Se recogió el precipitado resultante y se secó al vacío.

35 Ejemplo 28

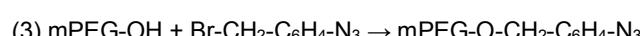
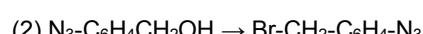
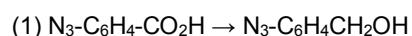
35 Este ejemplo representa la preparación del metansulfonil éster de polí(etylenglicol), que también se puede denominar metansulfonato o mesilato de polí(etylenglicol). Se pueden preparar el tosilato y los haluros correspondientes a través de procedimientos similares.



45 Se destiló azeotrópicamente el mPEG-OH (MW = 3.400, 25 g, 10 mmol) en 150 ml de tolueno durante 2 horas bajo nitrógeno y la solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 40 ml de CH₂C₁₂ seco y 2,1 ml de trietilamina seca (15 mmol). Se enfrió la solución en un baño de hielo y se añadieron 1,2 ml de cloruro de metansulfonilo destilado (15 mmol) por goteo. Se agitó la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche y se interrumpió la reacción mediante el añadido de 2 ml de etanol absoluto. Se evaporó la mezcla al vacío para extraer los disolventes, principalmente los que no eran tolueno, se filtró, se concentró nuevamente al vacío y se precipitó en 100 ml de éter dietílico. Se lavó el filtrado con varias partes de éter dietílico frío y se secó al vacío para obtener el mesilato.

50 Se disolvió el mesilato (20 g, 8 mmol) en 75 ml de THF y se enfrió la solución a 4 °C. A la solución fría se le añadió azida sódica (1,56 g, 24 mmol). Se calentó la reacción a reflujo bajo nitrógeno durante 2 horas. Despues se evaporaron los disolventes y se diluyó el resto con CH₂C₁₂ (50 ml). Se lavó la porción orgánica con solución de NaCl y se secó sobre MgSO₄ anhídrico. Se redujo el volumen a 20 ml y se precipitó el producto mediante el añadido a 150 ml de éter frío seco.

55 Ejemplo 29



65 El 4-azidobencil alcohol se puede producir utilizando el método descrito en la patente de EE.UU. 5.998.595. Se añadieron cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 ml, 20 mmol) a una solución de 4-

azidobencil alcohol (1,75 g, 11,0 mmol) en CH₂C₁₂ a 0 °C y se colocó la reacción en el refrigerador durante 16 horas. El tratamiento final habitual proporcionó el mesilato como un aceite amarillo pálido. Se disolvió este aceite (9,2 mmol) en THF (20 ml) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 ml) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el resto con acetato de etilo (3x15 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

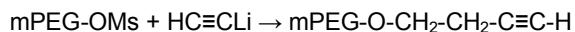
Se trató el mPEG-OH 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 ml) y se añadió el bromuro (3,32 g, 15 mmol) a la mezcla junto con una cantidad catalítica de KI. Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 ml) a la mezcla y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al resto CH₂C₁₂ (25 ml) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 ml. El añadido por goteo a una solución de éter (150 ml) produjo un precipitado, que se recogió para dar mPEG-O-CH₂-C₆H₄-N₃.

15 Ejemplo 30



20 Se disolvió NH₂-PEG-O-CH₂CH₂CO₂H (MW 3.400 Da, 2,0 g) en una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 ml) y se enfrió la solución a 0 °C. Se añadió propionato de 3-azido-1-N-hidroxisuccinimida (5 equiv.) con agitación fuerte. Despues de 3 horas, se añadieron 20 ml de H₂O y se agitó la mezcla durante otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con 0,5 N H₂SO₄ y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente 15 % (m/m). Se extrajo la mezcla de reacción con CH₂C₁₂ (100 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Despues de la precipitación con éter dietílico frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó al vacío para dar el derivado de PEG omega-carboxiazida.

25 Ejemplo 31



30 A una solución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparado como se conoce en la técnica y enfriado a -78 °C en THF, se le añade por goteo una solución de mPEG-OM disuelta en THF con agitación fuerte. Despues de 3 horas, se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se interrumpió con el añadido de 1 ml de butanol. Se añadieron 20 ml de H₂O y se agitó la mezcla durante otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con 0,5 N H₂SO₄ y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente 15 % (m/m). Se extrajo la mezcla de reacción con CH₂C₁₂ (100 ml x 3), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Despues de la precipitación con éter dietílico frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó al vacío para dar el 1-(but-3-inaloxi)-metoxipolietilenglicol (mPEG).

40 Ejemplo 32

45 Se pueden incorporar aminoácidos que contienen azida y acetileno seleccionando los sitios en proteínas usando los métodos descritos en L. Wang y col., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin y col., Science 301:964-7 (2003)), J. W. Chin y col., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin y P. G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11): 1135-1137; J. W. Chin y col., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024: y L. Wang y P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm, 1:1-11. Una vez que se han incorporado los aminoácidos, se lleva a cabo la reacción de cicloadición con proteína 0,01 mM en tampón fosfato (PB), pH 8, en presencia de derivado de PEG 2 mM, 1 mM CuSO₄ y ~1 mg de alambre de Cu durante 4 horas a 37 °C.

50 Ejemplo 33

Este ejemplo describe la síntesis de derivados de p-acetil-D,L-fenilalanina (pAF) y m-PEG-hidroxilamina.

55 La pAF racémica se sintetiza usando el proceso que se ha descrito previamente en Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. y Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746.

60 Para sintetizar el derivado de m-PEG-hidroxilamina, se completan los siguientes procedimientos. A una solución de ácido (N-t-Boc-aminooxi)acético (0,382 g, 2,0 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,16 ml, 1,0 mmol) en díclorometano (DCM, 70 ml), que se agita a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora se le añaden metoxipolietilenglicol amina (m-PEG-NH₂, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, de BioVectra) y diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,5 mmol). La reacción se agita a RT durante 48 horas y después se concentra a aproximadamente 100 ml. La mezcla se añade por goteo a éter frío (800 ml). El producto t-Boc-protégido se retira por precipitación y se recoge por filtración y se lava con éter 3x100 ml. Se purifica adicionalmente mediante una nueva disolución en DCM (100 ml) y la precipitación dos veces en éter (800 ml). El producto se seca al vacío con un rendimiento de 7,2 g (96 %), confirmado por RMN y prueba de nihidrina.

El deBoc del producto protegido (7,0 g) obtenido anteriormente se realiza en TFA al 50 %/DCM (40 ml) a 0 °C durante 1 hora y después a RT durante 1,5 hora. Después de extraer la mayor parte del TFA al vacío, la sal TFA del derivado de hidroxilamina se convierte en la sal HCl añadiendo HCl 4 N en dioxano (1 ml) al resto. El precipitado se disuelve en DCM (50 ml) y se precipita de nuevo en éter (800 ml). El producto final (6,8 g, 97 %) se recoge por filtración, se lava con éter 3x100 ml, se seca al vacío y se almacena bajo nitrógeno. Otros derivados de PEG (5K, 20K) hidroxilamina se sintetizan utilizando el mismo proceso.

Ejemplo 34

10 Estudios *in vivo* de relaxina PEGilada

[779] Se administran PEG-relaxina, relaxina no modificada y solución de tampón a ratones o ratas. Los resultados mostrarán actividad superior y vida media prolongada de la relaxina PEGilada de la presente invención en comparación con la relaxina no modificada. De forma similar, se administran relaxina modificada, relaxina no modificada y solución de tampón a ratones o ratas.

Análisis farmacocinético

20 Se administra un polipéptido de relaxina de la invención por vías intravenosa o subcutánea a ratones. Se toman muestras de sangre de los animales antes y en puntos de tiempo después de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo. Se puede calcular la vida media de eliminación y comparar entre polipéptidos de relaxina que comprenden un aminoácido codificado de modo no natural y relaxina de tipo silvestre o diversos polipéptidos de análogo de relaxina de la invención. De forma similar, se pueden administrar los polipéptidos de relaxina de la invención a monos cynomolgus. Se toman muestras de sangre de los animales antes y en puntos de tiempo después de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo.

25 Se puede administrar el polipéptido a los ratones mediante múltiples dosis, infusión continua o una dosis única, etc.

Ejemplo 35

30 Se expresa la relaxina utilizando el sistema de expresión de Novagen (promotor de T7 inducible; descrito detalladamente en el manual de sistemas de pET, versión 9, que se incorpora al presente por referencia), el vector de expresión pET30a y la cepa de expresión BL21(DE3).

35 Se inoculan 2 ml de cultivo de LB/kanamicina (10 µg/ml) con un barrido de la placa de BL21 (DE3) transformada con el análogo deseado. Esto disminuye los efectos causados por la variabilidad de colonia a colonia en los niveles de expresión. Se cultiva este cultivo durante la noche a 37 °C con agitación vigorosa y al día siguiente, se inoculan 10 ml del cultivo de LB/Kanamicina con 1 ml del cultivo realizado durante la noche (DO600 ~ 0,4-0,5). Los ml restantes del cultivo realizado durante la noche se pueden congelar como solución madre de glicerol.

40 Se colocan 10 ml del cultivo preparado a 37 °C y 250 rpm durante 30-45 min hasta que la DO600 llegue a 0,8-0,9. Se somete a inducción con 1 mM IPTG (se puede apartar 1 ml como control de cultivo no inducido), se cosecha generalmente 3-4 horas después de la inducción y se analiza en SDS-PAGE.

45 También es posible realizar un transcurso de tiempo de la expresión (por ejemplo los puntos 1, 2, 4, 6 horas después de la inducción y O/N) para determinar la tasa de acumulación, la estabilidad de la proteína, etc.

50 Análisis en gel: en un punto de tiempo deseado después de la inducción, se cosecha 1 ml del cultivo, se centrifugan las células, se resuspenden en 100 µl de 2X SDS-PAGE, se someten a ultrasonido para reducir la viscosidad y se corren 10 µl en SDS-PAGE. Si se desea, se puede comparar con el o los controles no inducidos o el control o patrón positivo conocido y se puede calcular el nivel de expresión (por ejemplo, una buena expresión podría ser > 100 µg/ml). También se puede utilizar análisis de transferencia Western. También es posible apartar 4 ml de los cultivos, preparar cuerpos de inclusión (si se expresan análogos insolubles) y obtener análisis de espectrometría de masas sobre estos para confirmar la identidad de la proteína sobreexpresada.

55 Para una expresión de la proteína a mayor escala, se inoculan > 250 ml de LB/Kanamicina (10 µg/ml) con 250 µl de solución madre de glicerol congelada y se cultiva durante la noche. Al día siguiente, se inoculan 10 X 1 l de los cultivos de LB/Kanamicina con 25 ml del cultivo realizado durante la noche (DO600 ~ 0,1).

60 Los cultivos de 1 l se cultivan a 37 °C y 250 rpm ~ 2h hasta que la DO600 llegue a 0,8-0,9. Se induce con 1 mM IPTG y se cosecha 4 h después de la inducción o a la mañana siguiente (se puede utilizar centrifugación durante 15 min a 4.000 rpm para la cosecha). Se enjuagan los sedimentos con 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (50 ml por sedimento + 50 ml para enjuagar la botella) si se desea reducir la endotoxina y facilitar la purificación. Se mezclan los sedimentos y se centrifugan nuevamente.

65

Ejemplo 36*Estudio de expresión de Pichia - Protocolos de preparación del ADN, electroporación, expresión*

- 5 Este ejemplo proporciona un protocolo para la preparación de polipéptidos de relaxina de la presente invención en *Pichia*. Se utilizan las SEQ ID NO: 34, 35, 36 y 37, y se puede utilizar un plásmido para clonar en *Pichia*, se puede utilizar este u otros plásmidos modificados para obtener la expresión de la proteína de los polipéptidos de relaxina en *Pichia*, se realizan las modificaciones al plásmido utilizando los métodos conocidos en la técnica.
- 10 El día 1 del protocolo, se realiza una digestión durante la noche, normalmente utilizando 2U de enzima por µg de ADN para digerir, se inoculan 10 ml de cultivo de YPhyD durante la noche en un matraz de 50 ml, con agitación a 260 rpm a 30 °C de la solución madre de glicerol.

Preparación del ADN

- 15 Se precipita el ADN mediante el añadido en primer lugar de 1/10º volúmenes de NaOAc 3M estéril y después de 0,7 volúmenes de IPA estéril, la muestra se agita con fuerza y se continúa la precipitación durante la noche a -20 °C o a -70 °C hasta el congelamiento. Se sedimenta el ADN por centrifugación (centrifuga de mesa 14.000 rpm/10 minutos), se extrae el sobrenadante y se lava el sedimento con 500 µl de ETOH estéril al 70 %. Se centrifuga (centrifuga de mesa 14.000 rpm/10 minutos) y se decanta el sobrenadante y se seca al aire el sedimento durante 15-20 minutos. Se resuspende el sedimento de ADN con agua estéril a 1 µg/µl y se transforma Pichia con 10 µg de ADN.

Electroporación

- 25 Se utiliza el cultivo preparado durante la noche con DO₆₀₀, se diluye en YPhyD a DO₆₀₀ = 0,2. Se agita el cultivo a 260 rpm a 30 °C hasta que la DO₆₀₀ alcanza 0,8-1,0. Se recogen las células por centrifugación (4000 rpm/5 minutos). Se decanta el medio, se lavan las células en 20 ml de agua estéril helada, se decanta nuevamente y se repite. Después del lavado con agua, se lava el sedimento en 20 ml de sorbitol 1 M estéril helado, se decanta y se resuspende, se lava el sedimento de células en 600 µl de sorbitol 1 M frío y después se puede almacenar sobre hielo.

- 35 De las células lavadas, se mezclan 50 µl con 10 µg de ADN linealizado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril, se mezcla suavemente y se incuba sobre hielo durante 25 minutos. Se transfiere la mezcla de células/ADN a una cubeta preenfriada de 0,2 cm utilizando puntas de pipeta largas. Las células se someten a electroporación utilizando una unidad BioRad GenePulsar II con la siguiente configuración: 2000 V, 200 Ohm, 25 µFd (usar monopolso), se añaden inmediatamente 0,5 ml de medio YPhyD a la cubeta y se mezclan por pipeteado. Se transfiere todo el contenido a un tubo de fondo redondo estéril y se agita suavemente (200 rpm) durante 30 minutos a 30 °C. Las células se colocan en placas y se dispersan uniformemente, se incuban las placas invertidas durante 3 días a 30 °C.

- 40 Despues de la incubación durante tres días, se eligen las colonias con un bucle, se inoculan 10 ml de medio BYPhyD en un matraz de 50 ml y se incuban durante 3 días a 30 °C. Se cuentan las colonias en las placas de 20µl, se registra la cantidad promedio y se cosechan las células, primero preparando 2 conjuntos de crioviales etiquetados con el nombre de la cepa y el número de clones, relaxina (es decir, la proteína expresada) y la fecha. Se transfiere el cultivo a un tubo cónico de 15 ml, se mide la DO₆₀₀ de cada cultivo, se diluye el cultivo 1:50 o 1:20 en medio YPhyD. Se guarda una alícuota del cultivo para la solución madre de glicerol. Se sedimenta la levadura a 4000 rpm durante 5 min a RT, se transfiere el sobrenadante a un tubo cónico de 15 ml nuevo etiquetado, y se guarda a -20 o -80 °C hasta que sea necesario para los datos analíticos.

50 Análisis de expresión de la proteína

Se corren muestras en gel TB NuPAGE al 4-12 % (Novex). Se utilizan reactivos de SDS-PAGE de Invitrogen, se analiza por análisis de transferencia Western o análisis de análisis de tinción de gel.

*55 Formulaciones de los medios***Dextrosa levadura Phytone tamponada (BYPhyD)**

Extracto de levadura	10 g/l
Peptona Phytone	20 g/l
Tampón fosfato de potasio 1 M (pH 6)	100 ml/l
10X YNB	100 ml/l
Dextrosa al 20 %	100 ml/l

Dextrosa levadura Phytone (YPhyD)	
Extracto de levadura	10 g/l
Peptona Phytone	20 g/l
Dextrosa al 20 %	100 ml/l

5 **10X YNB (Base de nitrógeno para levaduras al 13,4 % con sulfato de amonio sin aminoácidos)**
 Base de nitrógeno para levaduras 134 g/l

10 Ejemplo 37

15 *Producción de relaxina A21G*

En este ejemplo, se fermentó un cultivo de 4,0 l para producir 13,4 g de pasta de células húmeda y se realizó una preparación de un cuerpo de inclusión con y sin Triton-X100. Se produjeron 2,07 g de cuerpos de inclusión húmedos de este modo, seguido por solubilización y replegamiento. Se resuspendieron los cuerpos de inclusión con 200 ml de H₂O por gramo de cuerpos de inclusión húmedos (IB) hasta una concentración final de 3 mM y se añadió cisteína a la resuspensión. Se solubilizan los IB por aumento de pH a 11,5 durante 1 hora a RT. Se dejó que se produjera el replegamiento bajando el pH del material solubilizado a 10,6±0,1 y se guardó a 2-8 °C durante ~72 horas y estos resultados se muestran en las figuras 10A-10B. Se detuvo la reacción de replegamiento mediante el añadido de HCl hasta un pH final de 3,0, 0,45 µM se filtraron y se guardaron a 2-8 °C hasta su procesamiento posterior.

20 Se purificó la proteína replegada mediante el aumento del pH de la interrupción del replegamiento a 8,0 con base Tris y se cargó directamente en una columna HP Q. La conductividad de la carga en el caso que se muestra fue >3,5 mS/cm. Las condiciones de corrida fueron (A) Tris 20 mM, 8,0; (B) Tris 20 mM, 8,0; NaCl 200 mM y había 0-100 % B sobre 30CV. Se agrupó la proinsulina replegada correctamente y se recuperaron 79 mg de proinsulina.

25 Se realizó la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) y la precipitación con 25 mM zinc, se resuspendió la proteína precipitada hasta una concentración de 2 mg/ml con 20 mM NaOAc, 4,0, ACN al 30 %, 5 mM EDTA y se añadió 20K PEG hasta una proporción molar final de 10:1 de PEG a proteína y se dejó en incubación durante 48-72 horas a 28 °C.

30 Se diluyó la reacción de PEG 1:10 en 0,5X PEG tampón A, se filtraron 0,22 µM y se corrieron sobre una columna SP 650S. Las condiciones de corrida fueron (A) 10 mM NaOAc, 4,0, 1 mM EDTA; (B) 10 mM NaOAc, 4,0, 1 mM EDTA, 0,4 M NaCl; 0-50 %B sobre 20CV y se formularon las muestras de PEG en 10 mM citrato de sodio, 6,5; 150 mM NaCl y esto se muestra en la Figura 12.

35 Estos métodos se utilizaron para producir diversos polipéptidos de relaxina con aminoácidos no naturales y un intervalo de 0,1-22 mg para las cantidades de proteína finales de las variantes purificadas y PEGiladas. Se descubrió que el ACN ayuda a solubilizar la mezcla PEG/proteína en la reacción de PEG y la precipitación de zinc en pl facilitó la concentración en presencia de CAN.

40 Ejemplo 38

45 *Ensayo clínico humano de la seguridad o la eficacia de la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural.*

50 Meta: Observar la seguridad y la farmacocinética de la relaxina humana recombinante PEGilada administrada por vía subcutánea que comprende un aminoácido codificado de modo no natural.

55 Pacientes: se inscriben en el estudio dieciocho voluntarios sanos que varían entre 20 y 40 años de edad y pesan entre 60 y 90 kg. Los sujetos no tendrán valores de laboratorio anómalos clínicamente significativos para la hematología o química sérica y tendrán un examen toxicológico de orina, examen de VIH y antígeno de superficie de hepatitis B negativo. No deberían tener ningún indicio de lo siguiente: hipertensión; antecedentes de cualquier enfermedad hematológica primaria; antecedentes de enfermedad hepática, renal, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinaria, metabólica, neurológica significativa; antecedentes de anemia o trastorno de ictuss; sensibilidad conocida a productos derivados de bacterias o mamíferos, PEG o albúmina sérica humana; consumidor habitual y en gran cantidad de bebidas que contengan cafeína; participación en cualquier otro ensayo clínico o que hayan recibido una transfusión de sangre o que la hayan donado en un período de 30 días del ingreso al estudio; que hayan tenido exposición a relaxina en un período de tres meses del ingreso al estudio; que hayan tenido una enfermedad en un período de siete días del ingreso al estudio; y que tengan anomalías significativas en el examen físico previo al estudio o en las evaluaciones de laboratorio clínico en un período de 14 días del ingreso al estudio. Todos los sujetos son evaluables con respecto a la seguridad y se realizan todas las tomas de muestras de sangre para el análisis farmacocinético según lo programado. Todos los estudios se realizan con aprobación del comité de ética institucional y con el consentimiento del paciente.

Diseño del estudio: Este será un estudio cruzado de dos períodos, aleatorio, abierto, en centro único, de fase I en voluntarios varones sanos. Se asignan aleatoriamente dieciocho sujetos a uno de dos grupos de secuencia de tratamiento (nueve sujetos/grupo). Se administra relaxina durante dos períodos de dosificación separados como una inyección s.c. de bolo en la parte superior del muslo usando dosis equivalentes de relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural y el producto disponible en el mercado seleccionado. La dosis y frecuencia de administración del producto disponible en el mercado son como se indica en el prospecto. Se pueden añadir al estudio dosificación adicional, frecuencia de dosificación u otros parámetros según se deseé, utilizando los productos disponibles en el mercado incluyendo grupos adicionales de sujetos. Cada período de dosificación se separa por un período de 14 días sin tratamiento. Los sujetos deben permanecer en el centro de estudio al menos 12 horas antes y 72 horas después de la dosificación durante cada uno de los dos períodos de dosificación, pero no entre los períodos de dosificación. Se pueden añadir grupos adicionales de sujetos si también se van a evaluar la frecuencia, dosificación adicional u otro parámetro para la relaxina PEGilada. La formulación experimental de relaxina es la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural.

15 Toma de muestras de sangre: Se extrae sangre seriada por punción venosa directa antes y después de la administración de relaxina. Se obtienen muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones séricas de relaxina aproximadamente 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación (3 muestras de valores de referencia) y aproximadamente en los siguientes momentos después de la dosificación: 30 minutos y a las 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20 °C. Las muestras de suero se envían en hielo seco. Se realizan ensayos de laboratorio clínico en ayunas (hematología, química de suero y análisis de orina) inmediatamente antes de la dosis inicial el día 1, en la mañana del día 4, inmediatamente antes de la dosificación del día 16 y en la mañana del día 19.

20 Métodos bioanalíticos: Se utiliza un kit de ELISA para la determinación de las concentraciones séricas de relaxina.

25 25 Determinaciones de seguridad: se registran los signos vitales inmediatamente antes de cada dosificación (días 1 y 16) y 6, 24, 48 y 72 horas después de cada dosificación. Las determinaciones de seguridad se basan en la incidencia y en el tipo de eventos adversos, y en los cambios en los ensayos de laboratorio clínico con respecto a los valores de referencia. Además, se evalúan los cambios desde antes del estudio en las mediciones de los signos vitales, incluida la presión sanguínea, y los resultados del examen físico.

30 30 Análisis de datos: Los valores de concentración sérica posteriores a la dosis se corrigen con respecto a las concentraciones de relaxina de referencia antes de la dosis restando de cada uno de los valores posteriores a la dosis la concentración de relaxina de referencia promedio determinada promediando los niveles de relaxina de las tres muestras recogidas 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación. Las concentraciones séricas de relaxina antes de la dosis no se incluyen en el cálculo del valor promedio si están por debajo del nivel de cuantificación del ensayo. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración sérica corregidos con respecto a las concentraciones de relaxina de referencia. Los parámetros farmacocinéticos se calculan a través de métodos independientes del modelo en un sistema informático Digital Equipment Corporation VAX 8600 utilizando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración sérica máxima (Cmáx); tiempo hasta concentración sérica máxima (tmáx); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el momento cero hasta el momento de la última toma de muestra de sangre (AUC0-72) calculada utilizando la regla trapezoidal lineal; y vida media de supresión terminal (t1/2), calculada a partir de la constante de velocidad de supresión. La constante de velocidad de supresión se calcula por regresión lineal de 35 puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la gráfica de concentración-tiempo logarítmica-lineal. Se calculan el promedio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos para cada tratamiento. Se calcula la proporción de los promedios de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

40 40 45 Resultados de seguridad: La incidencia de los eventos adversos se distribuye uniformemente entre los grupos de tratamiento. No hay cambios clínicamente significativos con respecto a los valores de referencia o los ensayos de laboratorio clínico anteriores al estudio o las presiones sanguíneas, y no hay cambios notables desde antes del estudio en los resultados del examen físico ni en las mediciones de signos vitales. Los perfiles de seguridad para los dos grupos de tratamiento deberían ser similares.

50 50 55 Resultados farmacocinéticos: perfiles de concentración sérica de relaxina promedio-tiempo (no corregidos para los niveles de relaxina de referencia) en los 18 sujetos después de recibir relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural en cada punto de tiempo medido. Todos los sujetos deben tener concentraciones de relaxina de referencia pre-dosis dentro del intervalo fisiológico normal. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de suero corregidos con respecto a las concentraciones de relaxina de referencia promedio pre-dosis y se determinan Cmáx y tmáx. El tmáx promedio para cualquier comparador o comparadores clínicos seleccionados es significativamente más corto que el tmáx para la relaxina PEGilada que comprende el aminoácido codificado de modo no natural. Los valores de vida media terminal son significativamente más cortos para el comparador o los comparadores preclínicos evaluados en comparación con la vida media terminal para la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural.

Aunque el presente estudio se realiza en sujetos varones sanos, se preverán características de absorción y perfiles de seguridad similares en otras poblaciones de pacientes; tales como pacientes varones o mujeres con diabetes, pacientes varones o mujeres con cáncer o insuficiencia renal crónica, pacientes con insuficiencia renal pediátrica, pacientes en programas de pre-depósito autólogo o pacientes con cirugía electiva programada.

5 En conclusión, las dosis únicas administradas por vía subcutánea de relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural serán seguras y se tolerarán bien por sujetos varones sanos. Basándose en una incidencia comparativa de eventos adversos, valores de laboratorio clínico, signos vitales y resultados de exámenes físicos, los perfiles de seguridad de las formas disponibles en el mercado de relaxina y relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural serán equivalentes. La relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado de modo no natural potencialmente proporciona una gran utilidad clínica a los pacientes y a los proveedores de atención médica.

10 Ejemplo 39

15 Desarrollo del ensayo funcional de relaxina

Este ejemplo proporciona los detalles del ensayo funcional de relaxina.

20 Se utilizaron monocitos de sangre periférica humana, células THP-1, para demostrar el aumento medible de AMPc junto con los controles positivos Isoproterenol y Forskolin. Se preincubaron las células THP-1 en 500uM IBMX durante 30 minutos, se sometieron a coestimulación RLX con 2uM Forskolin durante 20 min. Isoproterenol, Forskolin y polipéptidos de relaxina, incluso natural A (con alanina en la 1º posición de aminoácido de la cadena B) y la variante RLX-BA1-AV13pAF (variante de relaxina con la secuencia de aminoácidos de la estructura de la alanina en la 1º posición de aminoácido de la cadena B con un pAF sustituido para la posición 13 (una valina) en la cadena A, con cuatro (4) PEG de tamaños diferentes unidos: 5K, 10K, 20K y 30K. TABLA 5

25 TABLA 5:

Ensayo funcional de valores de EC50 brutos [ng/ml]			
Muestra	11/4/2010	11/5/2010	11/5/2010
RLX-D-WT	1,5	1,5	1,0
RLX-A-WT-001	3,6	3,3	2,6
RLX-A-AQ1-20KPEG-001		38	
RLX-A-AA5-20KPEG-001		41	
RLX-A-AV13-20KPEG-001		56	
RLX-A-AR18-20KPEG-001		68	
RLX-A-BV7-20KPEG-001	54		
RLX-A-BA18-20KPEG-001	172		
RLX-A-BW28-20KPEG-001	172		
RLX-A-BE5-20KPEG-001			45
RLX-D-BE5-20KPEG-001			58
RLX-D-AL2-20KPEG-001			43

30 Ejemplo 40

Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos de relaxina PEGilados 20 kDa después de una inyección subcutánea única en ratas SD.

35 Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (SD) de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 7-8 semanas de edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio.

40 Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 80 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados con PEG-relaxina para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados):

Día 1: pre-dosis, 1, 2, 4, 8, 12, 25, 34, 50, 58, 73 y 80 horas después de la dosis.

45 Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva patrón generada a partir del

compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente. El análisis compartimentalizado se realizó utilizando dos compartimientos, modelo de supresión de 1º orden y la ecuación de ajuste de modelo Gauss-Newton (Levenberg-Hartley). La tabla 6 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de PEG-relaxina en función del tiempo. Las figuras 8A-8B compara la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para todos los compuestos de PEG-relaxina dosificados. Todos los grupos de dosis presentaron niveles de PEG-relaxina sérica medibles.

La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 9 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AQ1-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 10 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AA5-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 11 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AR18-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 12 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-BV7-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 13 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-BW28-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la Figura 14 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AV13.

Los datos del análisis no compartimentalizado de concentración sérica en función del tiempo de los animales dosificados por vía subcutánea se resume en la tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones séricas promedio para ratas SD después de una dosis única de PEG-relaxina.

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio ng/ml	SD (ng/ml)	N
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	1	30,8	19,4	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	2	87,4	25,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	4	184,8	50,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	8	237,6	61,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	12	371,2	106,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	25	394,0	50,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	34	278,7	59,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	50	63,4	11,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	58	45,6	6,8	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	73	20,3	5,6	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	80	11,6	1,3	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	1	19,9	6,4	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	2	100,1	51,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	4	185,0	104,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	8	264,7	128,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	12	434,3	135,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	25	438,0	55,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	34	353,5	44,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	50	86,9	19,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	58	62,4	10,6	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	73	32,8	8,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	80	22,1	5,4	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	1	33,9	17,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	2	109,7	32,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	4	172,7	48,2	5

(continuación)

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio ng/ml	SD (ng/ml)	N
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	8	270,5	55,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	12	332,5	57,7	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	25	398,6	37,6	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	34	264,3	33,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	50	76,7	6,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	58	61,8	9,0	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	73	25,0	4,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	80	14,9	37	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	1	25,7	4,6	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	2	98,9	20,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	4	248,5	75,5	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	8	343,5	81,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	12	457,3	91,0	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	25	518,5	57,7	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	34	270,4	64,5	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	50	104,0	14,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	58	63,5	8,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	73	26,0	3,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	80	22,6	2,6	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	1	36,4	15,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	2	107,9	61,5	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	4	228,5	86,0	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	8	380,9	144,0	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	12	486,6	135,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	25	511,0	60,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	34	404,8	51,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	50	184,2	31,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	58	122,3	37,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	73	48,8	6,1	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	80	37,1	5,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	1	44,9	16,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	2	138,9	60,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	4	345,7	117,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	8	533,6	157,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	12	630,1	201,2	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	25	742,5	117,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	34	540,7	31,0	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	50	320,9	21,3	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	58	209,4	22,5	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	73	75,0	4,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	80	58,7	7,7	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, pre-dosis

Tabla 7

	AQ1-RLX	AA5-RLX	AR18-RLX	BV7-RLX	BW28-RLX	AV13-RLX
HL terminal (h)	10,7	12,2	12,5	13,1	13,9	14,6
C_{máx} (ng/ml)	394,0	438,0	345,9	471,6	511,0	742,5
T_{máx} (h)	25,0	25,0	25,0	12,0	25,0	25,0
AUC_{inf} (ng*h/ml)	14237,9	16095,9	12985,5	17260,9	22191,2	32230,5
Vz (ml/kg)	540,7	547,4	694,7	546,9	452,6	325,4
CL (ml/h)	35,1	31,1	38,4	28,9	22,5	15,5
MRT (h)	26,7	29,4	27,7	27,9	31,1	32,7

Se evaluaron las curvas de concentración en función del tiempo por análisis no compartimentalizado (Pharsight, versión 4.1). N=5 ratas por grupo, HL terminal, vida media terminal; C_{máx}, concentración sérica máxima medida; T_{máx}, tiempo en el que se produjo la C_{máx}; AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración-tiempo para todas las muestras de suero/puntos de tiempo extrapolados al infinito; CL, supresión sérica total aparente; Vz, volumen de distribución aparente durante la fase terminal.

- 5 Las soluciones de dosis se midieron con los métodos ECLIA utilizados para las mediciones de concentración sérica. Las soluciones de dosificación se diluyeron de modo que se encontraran dentro del intervalo del ensayo. Todas las soluciones de dosis de 20KPEG-RLX se encontraron dentro del 30 por ciento de diferencia especificada con respecto al valor teórico (PDT, por sus siglas en inglés). La Tabla 8 a continuación resume los resultados de los análisis de solución de dosis para este estudio.
- 10

15

Tabla 8

Pre-dosis en tampón (DSA1)	Conc. nominal (ng/ml)	Factor de dilución	Conc. (ng/ml)	% PDT
RLX A-AQ1-20K PEG	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K PEG	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K PEG	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K PEG	500000	20000	571645	14

Ejemplo 41

- 20 Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas del compuesto de relaxina de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) después de una inyección subcutánea única en ratas SD.

25 Se obtuvieron ratas SD de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 5 semanas de edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio.

30 Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 12 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados con relaxina rh wt para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados): Día 1: pre-dosis, 0,33, 0,66, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 horas después de la dosis.

35 Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva patrón generada a partir del compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente.

40 La Tabla 9 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de relaxina rh wt en función del tiempo. La Figura 1 compara la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para la relaxina rh wt. Todos los animales presentaron niveles de relaxina sérica medibles.

La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 2 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de relaxina wt. Los datos del análisis no compartimentalizado de concentración sérica en función del

tiempo de los animales dosificados por vía subcutánea se resume en la Tabla 2. La Tabla 9 resume los análisis de solución de dosis. Las soluciones de dosificación cumplían con los criterios aceptables de inferior o igual al 30 % PDT.

5

Tabla 9

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/ml)	SD (ng/ml)	N
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	0,33	244,0	18,7	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	0,66	227,9	45,6	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	1	211,7	45,9	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	1,5	166,7	38,7	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	2	119,9	24,5	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	3	52,5	23,0	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	4	24,1	11,4	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	5	7,7	2,6	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	6	BQL	NE	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	9	BQL	NE	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	12	BQL	NE	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, pre-dosis

Tabla 10

Valores de parámetros farmacocinéticos para la relaxina rh wt dosificada en ratas SD.

	Relaxina rh wt
HL terminal (h)	0,8 (0,1)
Cmáx (ng/ml)	258,1(26,1)
Tmáx (h)	0,5 (0,2)
AUC _{inf} (ng*h/ml)	508,9 (81,8)
Vz (ml/kg)	1159 (284)
CL (ml/h)	1006 (185)
MRT (h)	1,56 (0,16)

10 Se evaluaron las curvas de concentración en función del tiempo por análisis no compartimentalizado (Pharsight, versión 4.1). N=5 ratas por grupo, HL terminal, vida media terminal; Cmáx, concentración sérica máxima medida; Tmáx, tiempo en el que se produjo la Cmáx; AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración-tiempo para todas las muestras de suero/puntos de tiempo extrapolados al infinito; CL, supresión sérica total aparente; Vz, volumen de distribución aparente durante la fase terminal. Los números son un promedio con la SD entre paréntesis.

15 Tabla 11

20 Las soluciones de dosis se midieron con los métodos ECLA utilizados para las mediciones de concentración sérica. Las soluciones de dosificación se diluyeron de modo que se encontraran dentro del intervalo del ensayo. Todas las soluciones de dosis de relaxina rh wt se encontraron dentro del 30 por ciento de diferencia especificada con respecto al valor teórico (PDT). La Tabla 3 a continuación resume los resultados de los análisis de solución de dosis para este estudio.

Tabla 11. Análisis de solución de dosis del artículo de prueba.

Análisis de solución de dosis	Conc. nominal (ng/ml)	Factor de dilución	Conc. (ng/ml)	% PDT
0,5 mg/ml pre-dosis en tampón de formulación (DSA1)	250000	10000	208830	-16
0,5 mg/ml pre-dosis en suero (DSA2)	250000	10000	225898	-10

25 Ejemplo 42

Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas de un compuesto de relaxina PEGilado de 20 kDa después de una inyección subcutánea o intravenosa única en ratas SD.

Se obtuvieron ratas SD de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 7-8 semanas de edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio. Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 82 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre

5 de los animales tratados con PEG-relaxina para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados): Día 1: pre-dosis, 1, 3, 5, 10, 25, 34, 48, 58, 72 y 82 horas después de la dosis.

10 Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva patrón generada a partir del compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente. El análisis compartimentalizado se realizó utilizando dos compartimientos, modelo de supresión de 1º orden y la ecuación de ajuste de modelo Gauss-Newton (Levenberg-Hartley).

15

20 La tabla 12 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de PEG-relaxina en función del tiempo.

Tabla 12

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/ml)	SD (ng/ml)	N
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	PD	BQL	NE	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	1	2912,8	203,7	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	3	1310,8	115,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	5	700,7	68,3	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	10	241,6	27,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	25	61,2	5,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	34	27,0	2,6	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	48	13,7	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	58	8,0	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	72	4,3	1,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	82	2,2	0,6	4
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	1	16,3	4,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	3	75,8	20,2	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	5	96,3	26,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	10	135,1	30,1	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	25	257,4	48,5	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	34	184,9	26,8	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	48	159,9	31,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	58	86,5	24,6	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	72	20,3	1,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	82	11,8	1,1	5
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	PD	BQL	NE	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	1	12,8	1,3	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	3	45,3	6,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	5	62,2	8,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	10	90,1	10,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	25	127,4	20,2	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	34	83,2	13,8	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	48	32,6	2,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	58	16,3	0,3	3

(continuación)

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/ml)	SD (ng/ml)	N
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	72	4,9	0,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	82	2,7	0,4	3
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	1	5,7	1,5	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	3	26,4	6,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	5	37,2	8,6	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	10	50,1	6,1	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	25	75,9	8,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	34	46,9	6,7	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	48	20,8	8,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	58	8,4	2,4	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	72	2,3	0,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	SC	Macho	82	1,3	0,4	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, pre-dosis

Ejemplo 43

- 5 Este ejemplo evalúa las dosis farmacológicamente activas y la exposición sistémica de la relaxina de tipo silvestre y una variante de PEG-relaxina en ratas Long-Evans hembra.

10 El objeto de estos estudios de generación de señales fue establecer la actividad *in vivo* y definir una dosis farmacológicamente activa de la variante de PEG-relaxina. Para lograr estos objetivos, se evaluaron criterios de valoración fisiológicamente pertinentes que responden a la relaxina en ratas Long-Evans hembra incluido el consumo de agua, la producción de orina y valores seleccionados de química clínica sanguínea y en orina. Para permitir la identificación de los criterios de valoración candidatos, se evaluó la relaxina de tipo silvestre en primer lugar (fase 1) a las dosis calculadas para lograr concentraciones en plasma de 0,3X, 1X y 10X de una inhibición diana *in vitro*. Las dosis objetivo se administraron por dosificación intravenosa (IV) en bolo, seguido de infusión continua de 6 horas. Las dosis de 0,3X, 1X y 10X de relaxina de tipo silvestre indujeron aumentos del 95 %, el 68 % y el 32 %, respectivamente, en el consumo de agua en comparación con el vehículo. Los cambios en las concentraciones de sodio en plasma promedio con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron -9,5 y 1,2 mEq/l para el vehículo (0X); -5,8 y -9,0 mEq/l a 0,3X; 1,0 y -1,5 mEq/l a 1X; -4,7 y -1,4 mEq/l a 10X. Los cambios en la osmolaridad plasmática con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron -20,7 y 1,0 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -11,0 y -19,1 mosmol/kg de agua a 0,3X; 0,3 y -4,4 mosmol/kg de agua para 1X; -10,3 y -3,8 mosmol/kg de agua para 10X.

25 Se administró PEG-relaxina (fase 2) en un volumen de bolo de 1 μ l por gramo de peso corporal, se recolectó sangre 2 y 6 horas después de la dosificación y se recolectó orina durante el período de 6 horas después de la dosificación. El tratamiento con PEG-relaxina con dosis de 0,1X, 0,3X y 1X produjo aumentos del 93 %, el 128 % y el 105 %, respectivamente, en el consumo de agua en comparación con el grupo de vehículo. Los cambios en las concentraciones de sodio en plasma promedio con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron 2,5 y 1,5 mEq/l para el vehículo (0X); -1,5 y -4,8 mEq/l a 0,1X; -4,0 y -2,9 mEq/l a 0,3X; -2,3 y -4,0 mEq/l a 1X. Los cambios en la osmolaridad plasmática con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron 4,5 y 2,1 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -5,1 y -11,0 mosmol/kg de agua a 0,1X; -8,2 y -5,0 mosmol/kg de agua para 0,3X; -5,6 y -9,5 mosmol/kg de agua para 1X. No se produjeron cambios claros en los valores de química clínica en orina después del tratamiento con relaxina de tipo silvestre o PEG-relaxina. Estos datos establecen una actividad *in vivo* y permiten una selección de dosis fundamentada para los estudios posteriores de modelos de enfermedades *in vivo* con PEG-relaxina.

35

Tabla 13: Diseño del grupo de animales

Grupo	Artículo de prueba	Id. del animal	Concentración en plasma (aumento en veces con respecto a diana)	Concentración de dosis en bolo IV (mg/ml)	Concentración de infusión IV (mg/ml) ^c	N.º de animales por grupo
Dosificación^a de relaxina de tipo silvestre de fase 1						
1	Relaxina tipo silvestre	1F001-1F004	1X	0,003	0,08	4

(continuación)

Grupo	Artículo de prueba	Id. del animal	Concentración en plasma (aumento en veces con respecto a diana)	Concentración de dosis en bolo IV (mg/ml)	Concentración de infusión IV (mg/ml) ^c	N.º de animales por grupo
Dosificación^a de relaxina de tipo silvestre de fase 1						
2	Relaxina tipo silvestre	2F001-2F004	10X	0,03	0,8	4
3 ^b	Relaxina tipo silvestre	3F001-3F004	Vehículo	Vehículo	Vehículo	4
4 ^b	Relaxina tipo silvestre	4F001-4F004	0,3X	0,001	0,026	4

^aLos grupos 1 y 2 (1x y 10x) se evaluaron primero y como se observaron efectos relacionados con el artículo de prueba sobre el consumo de agua potable, los hematocritos y la producción de orina, se revisaron las dosis para el segundo conjunto de ratas con respecto al vehículo y 0,3X en los grupos 3 y 4, respectivamente. Hubo un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 1 y 2. También hubo un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 3 y 4.

^bLas ratas en el grupo 1 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria y fueron asignadas al grupo 2 después del período sin tratamiento. Las ratas en el grupo 3 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria y fueron asignadas al grupo 4. Los números de los animales 001-004 siguieron siendo los mismos en los grupos 2 y 4 que eran en los grupos 1 y 3; sin embargo, las designaciones de número de grupo, grupo 2 y grupo 4, se utilizaron para permitir el etiquetado de los tubos y la claridad de identificación de las muestras.

^cSe inyectó relaxina de tipo silvestre por vía intravenosa en un volumen de bolo de 100 µl seguido de una tasa de infusión de 50 µl/hora.

Tabla 14:

Grupo	Artículo de prueba	Id. del animal	Concentración en plasma (aumento en veces con respecto a objetivo)	Concentración de dosis en bolo IV (mg/ml) ^a	N.º de animales por grupo
Dosificación de PEG-relaxina de fase 2					
5	PEG-relaxina	5F001-5F004	Vehículo	NA	4
6	PEG-relaxina	6F001-6F004	0,3X	0,03	4
7	PEG-relaxina	7F001-7F004	0,1X	0,01	4
8	PEG-relaxina	8F001-8F004	1,0X	0,1	4

La dosis en bolo se administró en un volumen de 1 µl/g de peso corporal.

5 *Relaxina de tipo silvestre de fase 1*

Se obtuvieron ratas Long-Evans hembra de 12-14 semanas de edad con catéteres bilaterales en la vena yugular colocados quirúrgicamente por el proveedor de Charles River Laboratories. Se utilizaron dos conjuntos de cuatro ratas. Se utilizó cada conjunto para evaluar dos dosis de relaxina de tipo silvestre. Hubo un período sin tratamiento de 36 horas o más entre los grupos 1 y 2 y los grupos 3 y 4 ya que las ratas de los grupos 1 y 3 se volvieron a utilizar en los grupos 2 y 4, respectivamente. Las ratas tenían acceso a voluntad a alimento y a agua y se colocaron en el sistema de jaula metabólica Culex ABS (Culex Automated Blood Sampler, Bioanalytical System Inc) la noche antes al inicio de la dosificación y durante las 6 horas posteriores a la dosis IV de bolo y el inicio de la dosificación por infusión.

15 *Administración de la dosis de relaxina de tipo silvestre de fase 1*

En la fase 1 cada rata recibió un bolo IV único y una infusión IV de 6 horas. La inyección IV de bolo se realizó a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente seguido de infusión IV a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente. Se dejó un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 1 y 2 en el primer conjunto de ratas y los grupos 3 y 4 en el segundo conjunto de ratas.

25 *PEG-relaxina de fase 2*

25 Se obtuvieron ratas Long-Evans hembra de 12-14 semanas de edad con catéteres bilaterales en la vena yugular colocados quirúrgicamente por el proveedor de Charles River Laboratories. Se utilizaron cuatro conjuntos de cuatro ratas, cada conjunto se utilizó para evaluar una dosis de PEG-relaxina. Las ratas que recibieron PEG-relaxina no se volvieron a utilizar después de un período sin tratamiento debido a la exposición plasmática ampliada de los compuestos PEGilados. Las ratas tenían acceso a voluntad a alimento y a agua y se colocaron en las jaulas metabólicas Culex ABS.

Administración de la dosis de PEG-relaxina de fase 2

En la fase 2, las ratas recibieron una inyección IV única a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente.

- 5 Todos los bolos y las soluciones de dosificación IV se formularon de acuerdo con estas instrucciones de descongelamiento y mezcla para todas las soluciones de dosis:
- 10 Se dejó descongelar el frasco de la muestra congelada para cada formulación de dosificación a 4 °C durante 3 a 4 horas, con inspecciones por hora del proceso de descongelamiento. Cuando se completó el descongelamiento, se mezcló la formulación con una inversión suave con cuidado de no formar burbujas. Se tuvo precaución para mezclar bien y suavemente cada formulación justo antes de la dosificación intravenosa. Se mantuvo cada formulación de dosificación a 4 °C hasta que se utilizó para la dosificación.
- 15 Las dosis se prepararon inmediatamente antes de la preparación y cada grupo recibió las siguientes concentraciones de dosis:

Fase 1 (grupos 1-4)	
Grupo 1: (1X)	bolo IV 0,003 mg/ml infusión IV 0,08 mg/ml
Grupo 2: (10X)	bolo IV 0,03 mg/ml infusión IV 0,8 mg/ml
Grupo 3: (vehículo)	bolo e infusión
Grupo 4: (0,3X)	bolo IV 0,001 mg/ml infusión IV 0,026 mg/ml
Fase 2 (grupos 5-8)	
Grupo 5:	bolo IV de vehículo NA
Grupo 6:	(0,3X) bolo IV 0,03 mg/ml
Grupo 7:	(0,1X) bolo IV 0,01 mg/ml
Grupo 8:	(1,0X) bolo IV 0,1 mg/ml

- 20 Los animales utilizados para este estudio se seleccionaron basándose en hallazgos aceptables de las mediciones de peso corporal, permeabilidad del catéter yugular y funcionalidad. Los animales identificados con catéteres no adecuados para la dosificación o la recolección de sangre antes del inicio del estudio o durante el período de recolección de sangre después del inicio de la dosificación fueron retirados del estudio y se reemplazaron por ratas con catéteres adecuados. El reemplazo de las ratas cateterizadas y la dosificación del compuesto se realizaron lo antes posible con respecto al plan de dosificación, la disponibilidad del personal y la recepción de ratas del proveedor.

- 25 Fase 1: Se asignaron aleatoriamente los animales de acuerdo con el peso corporal antes del estudio y se asignaron al grupo 1. Despues de completar la dosificación, las ratas en el grupo 1 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria después del período sin tratamiento y fueron reasignadas al grupo 2. Despues de completar la dosificación, las ratas en el grupo 3 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria después del período sin tratamiento y fueron reasignadas al grupo 4.

- 30 Fase 2: Se asignaron aleatoriamente los animales de acuerdo con el peso corporal antes del estudio y se asignaron a los grupos de 5 a 8.

- 35 Diariamente a los 30 minutos aproximadamente y 1, 2, 4, y 6 horas después del inicio de la dosificación. Se realizaron inspecciones visuales de los cambios físicos y del comportamiento, y los animales fueron analizados en cuanto a cambios en la postura corporal, pelaje, actividad, excremento, etc. Se obtuvieron mediciones rutinarias de los pesos corporales y se registraron antes de la dosificación.

- 40 Recolección, manipulación y análisis de muestras de sangre y orina

Protocolo del estudio de fase 1

- 45 La recolección de orina de referencia se inició la noche antes a las administraciones de las dosis, se continuó durante un período de 15-18 horas y se recolectaron en un frasco enfriado (hielo húmedo). Se recolectaron muestras de sangre de referencia (~400 µl de sangre entera) al final de la recolección de orina de referencia. El día del experimento, las ratas recibieron una inyección IV de bolo del artículo de prueba seguido de infusión continua con relaxina de tipo silvestre a una tasa de infusión constante administrada mediante una bomba de jeringa (Harvard 11 plus) durante 6 horas a través del catéter izquierdo de la vena yugular en volúmenes de 50 µl/hora. Se recolectaron dos muestras de sangre adicionales (~400 µl de sangre entera cada una) 2 y 6 horas después de la infusión de relaxina. Se recolectaron todas las muestras de sangre a través del catéter yugular derecho y se colocaron en tubos de muestras que contenían anticoagulante K3EDTA utilizando el método de muestreo programado de Culex ABS, se

5 almacenaron las muestras en un ambiente refrigerado hasta su procesamiento. Se recolectó orina en forma continua en un frasco enfriado a lo largo de la duración del período de infusión de relaxina. Se registró el volumen total de orina de cada recolección y se guardaron 2-5 ml de cada muestra de orina en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80°. Se registró el consumo de agua durante el período de infusión de 6 horas mediante la comparación del peso antes y después de la infusión del frasco + agua. Se detuvo la bomba de infusión después de 6 horas de infusión continua y se sometió a las ratas a un período sin tratamiento de al menos 36 horas antes de someterlas a la segunda evaluación de dosis.

10 Se necesitó infusión IV continua para mantener la concentración plasmática del fármaco buscada estable.

10 Protocolo del estudio de fase 2

15 La recolección de orina de referencia se inició la noche antes a las administraciones de las dosis durante un período de 15-18 horas y se recolectaron las muestras en un frasco enfriado. Se recolectaron muestras de sangre de referencia (~400 µl de sangre entera) al final del período de recolección de orina de referencia. El día del experimento, las ratas recibieron una dosis única de PEG-relaxina por vía intravenosa en un volumen que no superó los 10 ml/kg/día (dosis única). Se recolectaron dos muestras de sangre adicionales (~400 µl de sangre entera) 2 y 6 horas después de la administración de relaxina. Se recolectaron todas las muestras de sangre a través del catéter 20 yugular derecho y se colocaron en tubos de muestras que contenían anticoagulante K3EDTA utilizando el método de muestreo programado de Culex ABS, se almacenaron las muestras en un ambiente refrigerado hasta su procesamiento. Se recolectaron muestras de orina en forma continua desde el momento 0 hasta 6 horas después de la administración de PEG-relaxina en un frasco enfriado durante el muestreo. Se registró el volumen total de orina de 25 cada recolección y se guardaron 2-5 ml de cada muestra de orina en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80 °C. Se realizó eutanasia a las ratas 6 horas después de la dosificación. Se registró el consumo de agua durante el período de infusión de 6 horas mediante la comparación del peso del frasco + agua al principio y al final del período de infusión del fármaco.

25 Patología

30 Se recolectaron muestras de orina como se describió anteriormente en este ejemplo. Se congelaron de dos a 5 ml de muestras de orina enfriadas sobre hielo seco y se guardaron en un sistema de congelador para mantenerlas a aproximadamente -80 °C hasta su envío sobre hielo seco a AVL para el análisis de la creatinina en orina y BUN para determinar la supresión de la creatinina.

35 Se recolectó una muestra de sangre utilizando el Culex ABS que utiliza K3EDTA como anticoagulante. Se colocaron quince microlitros de muestras de sangre entera en tubos capilares no tratados, se sellaron con arcilla en un extremo y se centrifugaron en una centrífuga de hematocritos (International Equipment Company, centrífuga IEC MB) durante cinco minutos. Se obtuvieron los resultados de hematocritos utilizando un dispositivo de lectura de microhematocritos proporcionado por el fabricante.

40 Se recolectó sangre para la determinación potencial de exposición sistémica de la relaxina de tipo silvestre y la PEG-relaxina de acuerdo con el plan de recolección y los procesos enumerados a continuación. Hubo tres intervalos de recolección. Los puntos de tiempo de recolección fueron 0, 2 y 6 horas después de la dosis para las ratas de la fase 45 1 y la fase 2. Fase 1: 8 animales por punto de tiempo. Fase 2: 16 animales por punto de tiempo. El volumen de recolección fue cercano a 400 microlitros de sangre entera. Se tomaron muestras de sangre de todos los animales en los grupos de 1 a 8 en tres puntos de tiempo: referencia (pre-dosis t=0) y 2 y 6 horas después del inicio de la infusión para la dosificación IV de relaxina de tipo silvestre y después de la dosificación IV para los grupos de dosificación de PEG-relaxina, respectivamente. Se registraron el momento del inicio de la dosificación por infusión IV y el momento real de cada toma de muestra de sangre en los datos brutos para cada animal. Por decisión del patrocinador, la sangre no se envió a Ambrx para las determinaciones de exposición sistémica durante la realización 50 del estudio. Las muestras se almacenaron congeladas en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80 °C y serán devueltas al patrocinador.

55 RESULTADOS de la relaxina de tipo silvestre de fase I

60 El consumo de agua promedio durante la infusión de 6 horas de las ratas tratadas con vehículo (0X) fue de 1,8 ml cada 100 gramos de peso corporal, y aumentó a 3,6, 3,1 y 2,4 ml cada 100 gramos de peso corporal en las ratas tratadas con 0,3X, 1X y 10X de relaxina de tipo silvestre, respectivamente. Son aumentos del 95 %, el 68 % y el 32 % sobre el vehículo para los grupos de dosificación de 0,3X, 1X y 10X respectivamente.

65 El promedio de hematocritos de referencia, 2 y 6 horas después del inicio de la dosificación fue del 35,1 %, el 35,0 % y el 34,3 % en las ratas tratadas con vehículo, respectivamente; del 33,1 %, el 33,7 % y el 32,3 % en el grupo de 0,3X; del 31,4 %, el 32,0 % y 33,7 % en el grupo de 1X; del 29,7 %, el 31,9 % y el 30,4 % en el grupo de 10X.

65 La producción de orina promedio durante la infusión de 6 horas fue de 1,8, 1,5, 1,2 y 1,2 ml cada 100 gramos de peso corporal para los grupos de vehículo (0X), 0,3X, 1X y 10X respectivamente.

La concentración de sodio en plasma promedio de referencia, 2 y 6 horas después del inicio de la dosificación fue de 139,3, 129,8, 140,5 mEq/l en el grupo de vehículo (0X); 141,8, 136,0 y 132,8 mEq/l en el grupo de 0,3X; 138,8, 139,8 y 137,3 mEq/l en el grupo de 1X; 137,0, 132,3 y 135,6 mEq/l en el grupo de 10X. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de -9,5 y 1,2 mEq/l para el vehículo (0X); -5,8 y -9,5 mEq/l a 0,3X; 1,0 y -1,5 mEq/l a 1X; -4,7 y -1,4 mEq/l a 10X.

Se calculó la osmolaridad plasmática utilizando la siguiente ecuación: Osmolaridad (OSM) = $(2 \cdot \text{na}) + (\text{Glu}/18) + (\text{BUN}/2,8)$. La osmolaridad plasmática promedio de referencia, 2 y 6 horas después del inicio fue de 277,3 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,3X; 291,0, 291,3 y 286,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 1X; 286,4, 276,1 y 282,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 10X. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de -10,7 y 1,0 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); +11,0 e +19,1 mosmol/kg de agua a 0,3X; 0,3 y -4,4 mosmol/kg de agua para 1X; -10,3 y -3,8 mosmol/kg de agua para 10X. Los datos de química clínica en orina de supresión de BUN/Cr, Na se resumen en las tablas a continuación:

15 **Tabla 3. Resumen de datos de química clínica en orina de relaxina de tipo silvestre (estudio de fase 1)**

Grupos	BUN /Cr	sem	Supresión de Na (mEq/h)	sem	Supresión de BUN (mg/h)	sem	CrCl (ml/min/100g)	sem
Vehículo (referencia)	36	12	0,083	0,010	13,5	4,4	0,65	0,04
	26	3	0,079	0,018	9,4	2,3	0,60	0,15
0,3X (referencia)	66	9	0,055	0,005	17,3	3,9	0,38	0,06
	43	6	0,071	0,015	12,1	1,3	0,45	0,07
1X (referencia)	18	2	0,046	0,010	7,6	1,5	0,62	0,09
	19	4	0,030	0,003	4,6	1,5	0,36	0,05
10X (referencia)	21	2	0,063	0,001	8,5	1,1	0,69	0,04
	17	4	0,055	0,005	4,9	0,7	0,81	0,11

Tabla 4. Datos brutos de química clínica en orina de relaxina de tipo silvestre (estudio de fase 1)

DOSIS	Grupo	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl (ml/min/100 g)
Vehículo	3F001 T0	68232	136	119	84	1080	0,702
Vehículo	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0,257
Vehículo	3F002 T0	68234	122	130	59	980	0,692
Vehículo	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0,979
Vehículo	3F003 T0	68236	276	130	54	2950	0,694
Vehículo	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0,552
Vehículo	3F004 T0	68238	355	126	52	3000	0,522
Vehículo	3F004 T6	68239	176	152	71	1320	0,614
0,3X	4F001 T0	68791	272	47	22	1950	0,413
0,3X	4F001 T6	68792	174	112	25	1500	0,356
0,3X	4F002 T0	68793	274	68	42	1860	0,522
0,3X	4F002 T6	68794	180	88	42	1500	0,657
0,3X	4F003 T0	68795	230	54	25	1800	0,329
0,3X	4F003 T6	68796	180	82	60	1880	0,449
0,3X	4F004 T0	68797	225	68	23	1440	0,260
0,3X	4F004 T6	68798	365	152	68	3100	0,352
1X	1F001-T0	67488	194	<40	64	1480	0,526
1X	1F001-T6	67489	138	62	57	960	0,394
1X	1F002-T0	67487	203	74	93	1540	0,579
1X	1F002-T6	67496	296	161	88	1300	0,337

(continuación)

DOSIS	Grupo	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl (ml/min/100 g)
1X	1F003-T0	67490	110	85	64	820	0,495
1X	1F003-T6	67495	176	167	104	1440	0,236
1X	1F004-T0	67483	224	74	67	1420	0,882
1X	1F004-T6	67492	94	<40	24	740	0,476
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0,670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0,729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0,598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0,618
10X	2F003-T0	67491	254	<40	103	1650	0,696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1,129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0,809
10X	2F004-T6	67493	212	125	85	1400	0,756

Unidades: Na (mEq/l); creatinina (mg/dl); BUN (mg/dl), glucosa (mg/dl), K (mmol/l). CrCl: ml/min/100 g BW
Supresión de creatinina (CrCl)= (U creat. * U vol)/(P creat* U tiempo)

Tabla 5. Resumen de datos fisiológicos de relaxina de tipo silvestre (estudio de fase 1)

Dosis	Consumo de agua (0-6h) ml/100 g BW		Orina de referencia (-16-0h) ml/100 g BW		Orina (0-6h) ml/100 g BW	
	media	sem	media	sem	media	sem
Vehículo	1,8	0,4	4,1	0,4	1,8	1,2
	3,6	0,2	5,7	1,1	0,3	0,6
	3,1	0,6	3,8	0,6	1,5	1,2
	2,4	0,7	4,3	0,8	0,4	0,1
Hematocrito (%)						
Dosis	0 h		2 h		6 h	
	media	sem	media	sem	media	sem
Vehículo	35,1	1,0	35,0	0,9	34,3	0,5
	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4
	31,4	2,7	32,0	2,9	33,7	2,1
	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4

5 RESULTADOS de la variante de PEG-relaxina de fase 2

El consumo de agua promedio durante el período de 6 horas después de la dosis de las ratas tratadas con vehículo (0X) fue de 1,5 ml cada 100 gramos de peso corporal, y aumentó a 2,9, 3,4 y 3,1 ml cada 100 gramos de peso corporal en las ratas tratadas con 0,1X, 0,3X y 1X de variante de PEG-relaxina, respectivamente. Estos representan aumentos del 93 %, el 128 % y el 105 % sobre el promedio de los grupos de vehículo para los grupos de 0,1X, 0,3X y 1X, respectivamente.

La producción de orina promedio durante el período de 6 horas después de la dosis fue de 0,9, 0,2, 0,5 y 0,4 ml cada 100 gramos de peso corporal para el vehículo (grupos de 0X, 0,3X y 1X respectivamente). Las concentraciones de sodio en plasma promedio de referencia, 2 y 6 horas después de la dosificación fueron de 136,3, 138,8 y 137,8 mEq/l en el grupo de vehículo (0X), respectivamente; 138,5, 137,0 y 133,7 mEq/l en el grupo de 0,1X, respectivamente; 137,5, 133,5 y 134,6 mEq/l en el grupo de 0,3X, respectivamente; 137,3, 135,0 y 133,3 mEq/l en el grupo de 1X, respectivamente. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de 2,5 y 1,5 mEq/l para el vehículo (0X); -1,5 y -4,8 mEq/l a 0,1X; -4,0 y -2,9 mEq/l a 0,3X; -2,3 y -4,0 mEq/l a 1X.

La osmolaridad plasmática promedio de referencia, 2 y 6 horas después de la dosificación fue de 285,4, 289,9 y 287,5 mosmol/kg de agua en el grupo de vehículo (0X), respectivamente; 292,7, 287,6 y 281,7 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,1X, respectivamente; 287,6, 279,4 y 282,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,3X, respectivamente; 289,3, 283,7 y 279,4 mosmol/kg de agua en el grupo de 1X, respectivamente. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de 4,5 y 2,1 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -5,1 y -

20

25

11,0 mosmol/kg de agua a 0,1X; -8,2 y -5,0 mosmol/kg de agua para 0,3X; -5,6 y -9,9 mosmol/kg de agua para 1X.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son solamente para fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos para aquellos expertos en la materia.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Kraynov, Vadim Knudsen, Nick Hewet, Amha de Dios, Kristine Pinkstaff, Jason Sullivan, Lorraine

<120> Polipéptidos de relaxina modificados y sus usos

<130> AMBX-0174.00PCT

15 <150> 61/374.582

<151> 17-08-2010

20 <160> 34

25 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 53

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45

30 Met Ser Thr Trp Ser
50

35 <210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser
50

<210> 3
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu
 20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly
 35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
 50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 85

10

<210> 4
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
 1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 20

20

<210> 5
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
 20 25

30

<210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ala	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val
1				5					10				15		

Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Ser	Thr	Trp	Ser			
			20					25							

5 <210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 7

Arg	Arg	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Val	Gly	Gln	Val	Glu	Leu	Gly	Gly
1				5				10				15			

Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Ser	Leu	Gln	Pro	Leu	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	Leu
			20					25				30			

Gln	Lys	Arg													
		35													

15 <210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met	Lys	Lys	Asn	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Arg					
1				5				10							

20

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Met	Ile	Glu	Gly	Gly	Arg										
			1		5										

30 <210> 10

<211> 72

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 10

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatcttt 60

gctagatttt gc 72

40 <210> 11

<211> 87

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 11

	gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgca aattagttcg cgcgagatt	60
	gccatttgcg gcatgagcac ctggagc	87
	<210> 12	
5	<211> 159	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12	
	caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgtt gttgtaccaa aagatcttt	60
	gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt	120
10	cgcgcgcaga ttgccattt cgccatgagc acctggagc	159
	<210> 13	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
	atgaaaaaga atatcgatt tcttcttaaa cgg	33
20	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
	atgattgaag gtggtcgt	18
30	<210> 15	
	<211> 94	
	<212> PRT	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15	
	Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu	
	1 5 10 15	
	Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser	
	20 25 30	
	Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu	
	35 40 45	
	Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu	
	50 55 60	
	Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys	

ES 2 742 296 T3

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 16
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetasa mutante derivada de la sintetasa de *Methanococcus jannaschii*

10 <400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 17

<211> 77

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNt mutante derivado del ARNt de *Methanococcus jannaschii*

10 <400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcattggcg ctggttcaaa 60

tccagccccgc cggacca 77

15 <210> 18

<211> 77

<212> ADN

<213> *Methanococcus jannaschii*

20 <400> 18

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcattggcg ctggttcaaa 60

tccggccccgc cggacca 77

25 <210> 19

<211> 88

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 742 296 T3

<223> Un supresor de ARNt ámbar optimizado

<400> 19

	cccagggtag ccaagctcg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc	60
5	gagggttcga atcccttccc tggacca	88

<210> 20

<211> 89

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un supresor de ARNt de cambio de marco AGGA optimizado

15 <400> 20

	gcgagggtag ccaagctcg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt	60
	cgagggttcg aatccctccc ctgcacca	89

20 <210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina

<400> 21

	Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser	
	1 5 10 15	
	Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly	
	20 25 30	
	Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln	
	35 40 45	
	Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile	
	50 55 60	
	Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp	
	65 70 75 80	
	Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met	
	85 90 95	
	Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys	
	100 105 110	
	Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys	
	115 120 125	
	Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro	

ES 2 742 296 T3

130

135

140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 22
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina

<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

5

10

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

ES 2 742 296 T3

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

5 <210> 23
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina
<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300

Leu
 305

<210> 24

<211> 305

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

10 <400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
 145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
 165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
 180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
 195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
 210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
 245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
 260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
 275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
 290 295 300

Leu
 305

<210> 25
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 25

Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
1					5					10				15	

Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Ala
						20		25					30		

Ile	Gly	Phe	Glu	Pro	Ser	Gly	Lys	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Gln
						35		40				45			

Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
						50		55				60			

Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
						65		70			75			80	

Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
						85		90					95		

Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Lys	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys
						100		105					110		

Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
						115		120				125			

Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
						130		135			140				

Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Ala	Ile	Tyr
						145		150			155			160	

Leu	Ala	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile	His
						165		170				175			

Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His	Asn
						180		185				190			

Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser	Lys
						195		200			205				

Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala	Lys
						210		215			220				

Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro	Ile
						225		230			235			240	

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 26

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 26

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

ES 2 742 296 T3

130

135

140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

5 <210> 27
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina
<400> 27

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 28
 <211> 306

5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina
 <400> 28

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

ES 2 742 296 T3

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 29

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10 <400> 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
 145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 30
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

ES 2 742 296 T3

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 31

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

10 <400> 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

ES 2 742 296 T3

130

135

140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
 145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 32

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

10

<400> 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

5 <210> 33
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina
 <400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
 145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 34

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

10

<400> 34

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
 145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de relaxina modificado que comprende un aminoácido codificado de modo no natural, en donde:
 - 5 (a) el polipéptido de relaxina comprende el polipéptido de cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: resto 1 de cadena A, resto 5 de cadena A, resto 13 de cadena A, resto 18 de cadena A y resto 7 de cadena B; y
 - 10 (b) el aminoácido codificado de modo no natural es para-acetil-fenilalanina que está opcionalmente enlazado a un enlazador, un polímero, un polímero soluble en agua o una molécula biológicamente activa.
2. El polipéptido de relaxina modificado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de cadena B de relaxina es un polipéptido de SEQ ID NO: 6.
- 15 3. El polipéptido de relaxina modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho aminoácido codificado de modo no natural está en la posición del resto 1 de la cadena A.
- 20 4. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a dichos enlazador, polímero, polímero soluble en agua o molécula biológicamente activa.
- 25 5. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a dichos enlazador, polímero, polímero soluble en agua o molécula biológicamente activa mediante un enlace oxima.
- 30 6. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero soluble en agua.
- 35 7. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el aminoácido codificado de modo no natural está enlazado a un polímero que comprende poli(etilenglicol).
- 40 8. El polipéptido de relaxina modificado de la reivindicación 7, en donde dicho poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa, de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa, de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 40 kDa, de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa o de aproximadamente 20 kDa.
- 45 9. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho polipéptido de relaxina modificado es recombinante, se produce en una célula hospedadora eucariota, se produce en una célula hospedadora no eucariota o se produce por traducción *in vitro*.
- 50 10. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido de relaxina modificado exhibe una vida media sérica aumentada en comparación con el polipéptido de relaxina de tipo silvestre que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, en donde la vida media sérica se aumenta opcionalmente en una cantidad seleccionada de al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces o al menos aproximadamente diez veces.
- 55 11. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido de relaxina modificado es biológicamente activo.
- 60 12. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso como un medicamento.
- 65 13. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de aterosclerosis; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; cardiopatía coronaria; esclerodermia; ictus; disfunción diastólica; hipercolesterolemia familiar; hipertensión sistólica aislada; hipertensión primaria; hipertensión secundaria; hipertrofia ventricular izquierda; rigidez arterial asociada a tabaquismo a largo plazo; rigidez arterial asociada a obesidad; rigidez arterial asociada a edad; lupus eritematoso sistémico; preeclampsia; hipercolesterolemia; o para su uso en el aumento de la distensibilidad arterial en mujeres perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en mujeres posmenopáusicas con riesgo de sufrir alguno de los trastornos mencionados anteriormente; o para modular la vasoconstricción, la producción de NO o la agregación de plaquetas; o para su uso en el tratamiento de vasoconstricción mediada por angiotensina II (AngII) o vasoconstricción mediada por endotelina 1 (ET-1); o para su uso en insuficiencia cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés de la pared ventricular o una integración deteriorada de la vasodilatación arterial y venosa.
- 70 14. El uso del polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que sufre de aterosclerosis; diabetes tipo 1; diabetes tipo 2;

cardiopatía coronaria; esclerodermia; ictus; disfunción diastólica; hipercolesterolemia familiar; hipertensión sistólica aislada; hipertensión primaria; hipertensión secundaria; hipertrofia ventricular izquierda; rigidez arterial asociada a tabaquismo a largo plazo; rigidez arterial asociada a obesidad; rigidez arterial asociada a edad; lupus eritematoso sistémico; preeclampsia; hipercolesterolemia; o para su uso en el aumento de la distensibilidad arterial en mujeres

5 perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en mujeres posmenopáusicas con riesgo de sufrir alguno de los trastornos mencionados anteriormente; o para modular la vasoconstricción, la producción de NO o la agregación de plaquetas; o para su uso en el tratamiento de vasoconstricción mediada por angiotensina II (AngII) o vasoconstricción mediada por endotelina 1 (ET-1); o para su uso en insuficiencia cardiaca, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés de la pared ventricular o una integración deteriorada de la vasodilatación arterial y venosa.

10 15. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 o el polipéptido de cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 sustituido con un aminoácido codificado de modo no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: resto 1 de cadena A, resto 5 de cadena A, resto 13 de cadena A, resto 18 de cadena A y resto 7 de cadena B, en donde el aminoácido codificado de modo no natural es para-acetil-fenilalanina, la célula hospedadora comprende una ARNt

15 sintetasa ortogonal y/o un ARNt ortogonal que, cuando se traduce dicho ácido nucleico da como resultado la incorporación de dicho aminoácido codificado de modo no natural en dichos polipéptido de cadena A de relaxina o polipéptido de cadena B de relaxina y el polinucleótido comprende al menos un codón selector opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en un codón ámbar, un codón ocre, un codón ópalo, un codón único, un codón 20 raro, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases, en donde dicho codón selector codifica dicho aminoácido codificado de modo no natural.

20 16. Un método de fabricación del polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende: cultivar células que comprenden (1) un polinucleótido o polinucleótidos que codifican dicho polipéptido de cadena A de relaxina y dicho polipéptido de cadena B de relaxina comprendiendo un codón selector que codifica dicho aminoácido codificado de modo no natural, (2) una ARN sintetasa ortogonal y (3) un ARNt ortogonal en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de relaxina que comprende dicho aminoácido codificado de modo no natural; y purificar el polipéptido de relaxina que comprende dicho aminoácido codificado de modo no natural.

30

Figura 1

Gris claro = cadena A
Gris oscuro = cadena B
Negro = sitios seleccionados

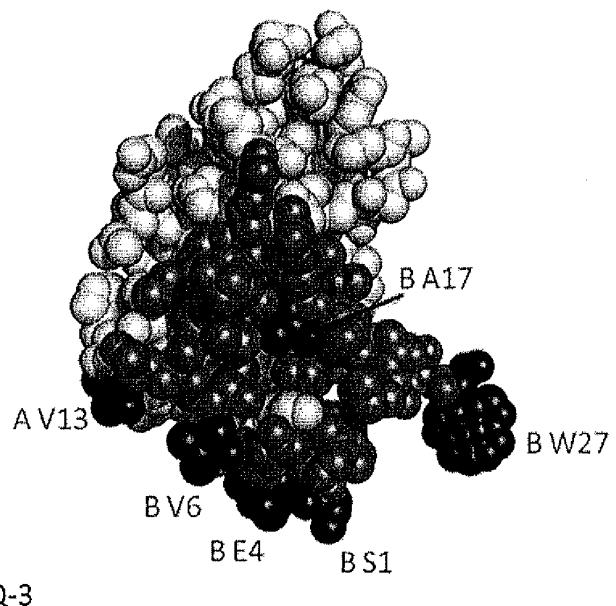


Figura 2

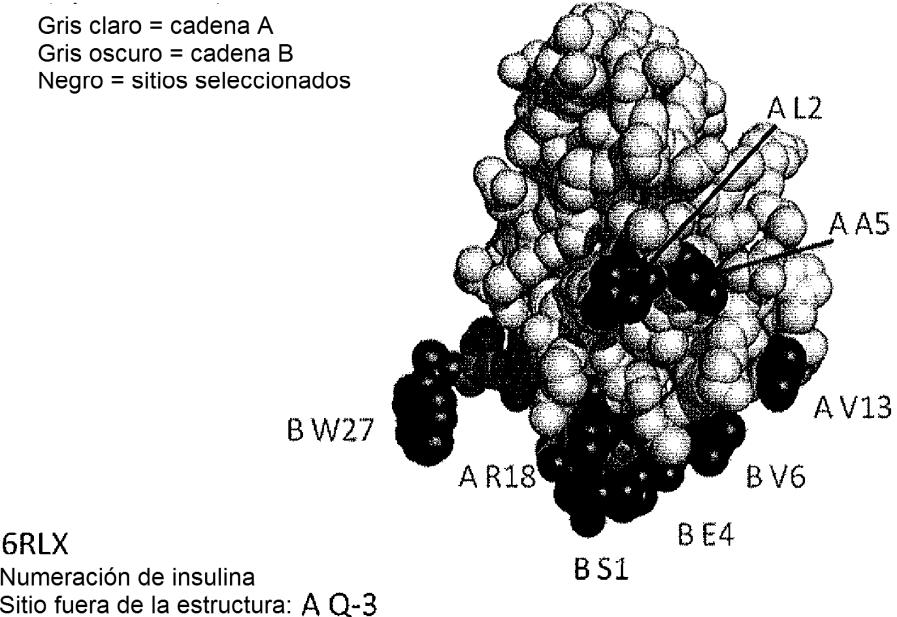
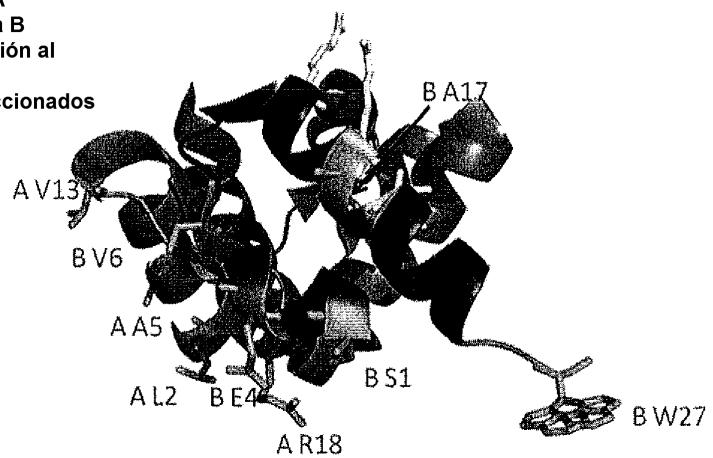


Figura 3

Azul claro = cadena A
Azul oscuro = cadena B
Amarillo = sitio de unión al
receptor
Naranja = sitios seleccionados



6RLX

Numeración de insulina

Sitio fuera de la estructura: A Q-3

Figura 4

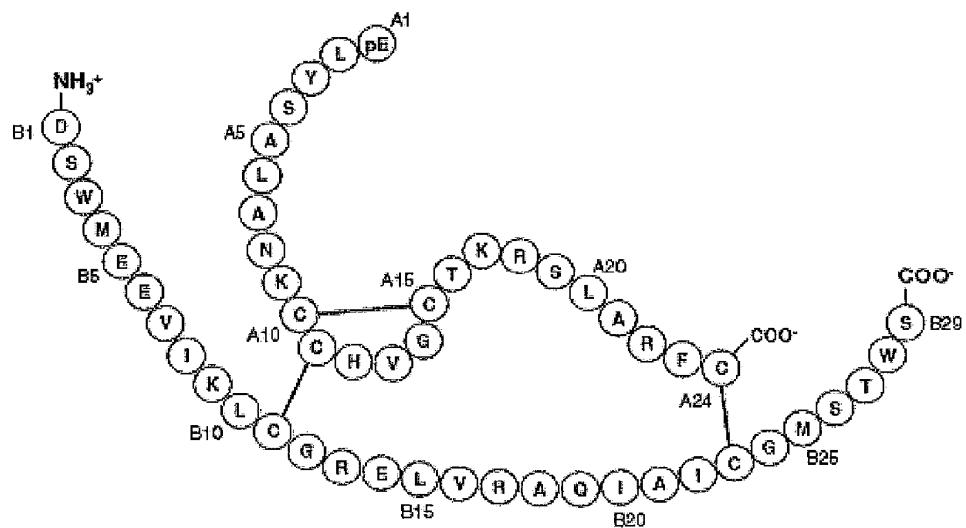


Figura 5

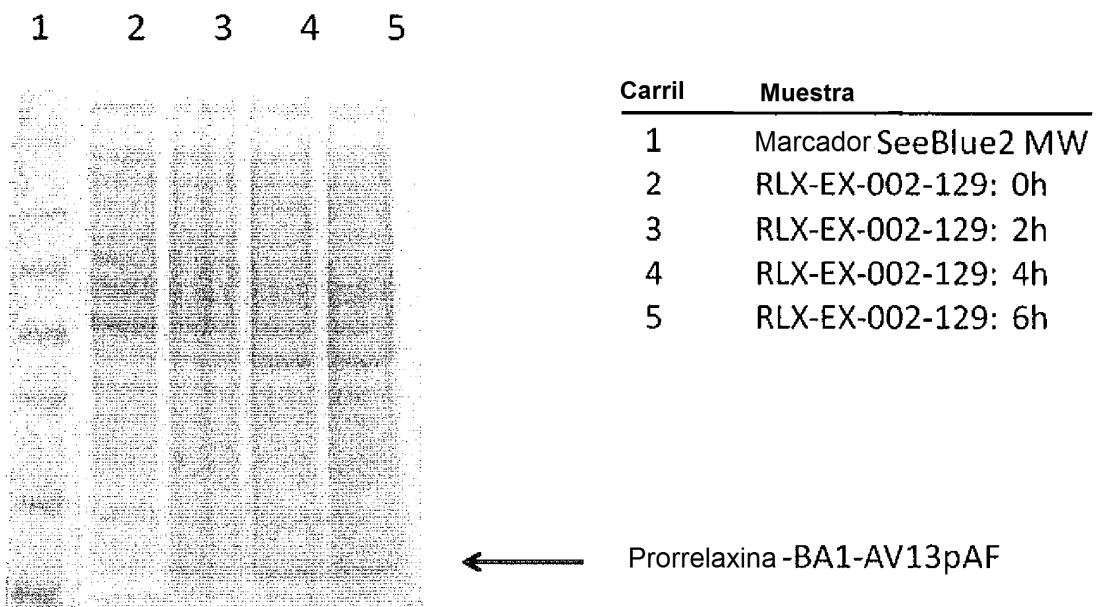
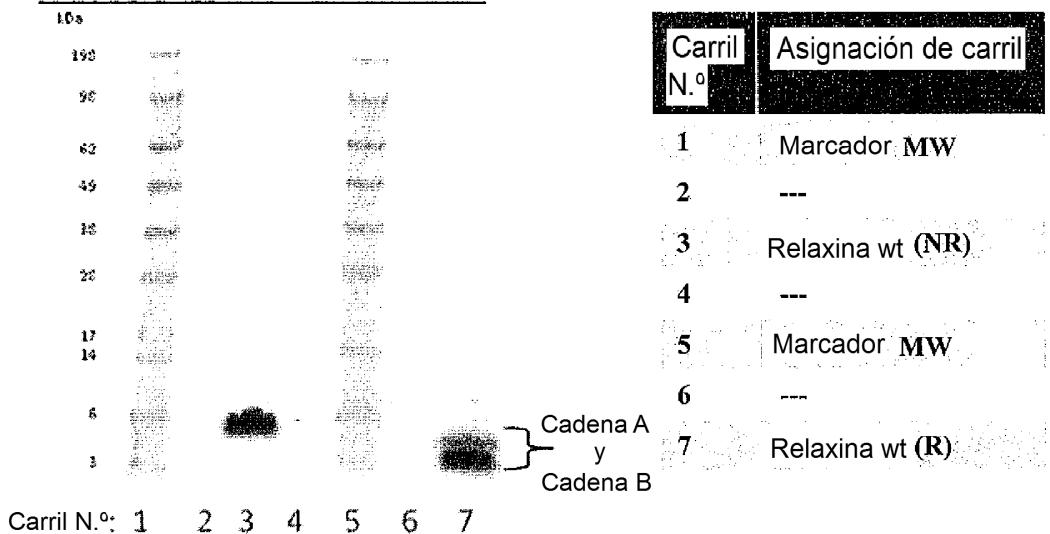


Figura 6

A.

SDS-PAGE → Relaxina no PEGilada

B.

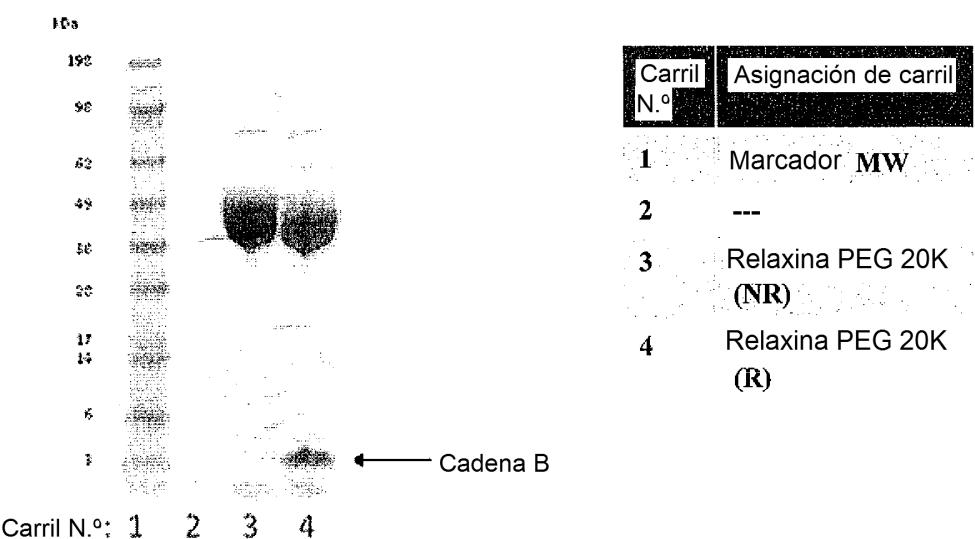
SDS-PAGE → Relaxina PEGilada 20K

Figura 7

Evaluación PK de tamaño de PEG

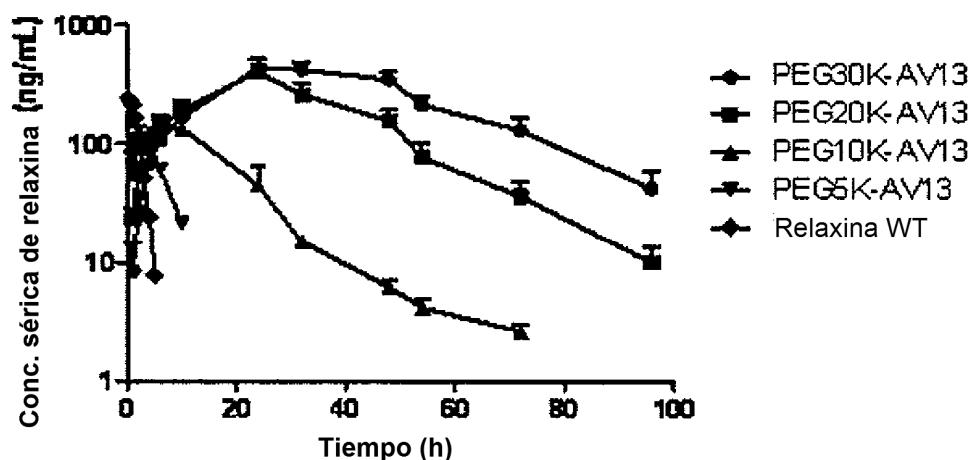


Figura 8A

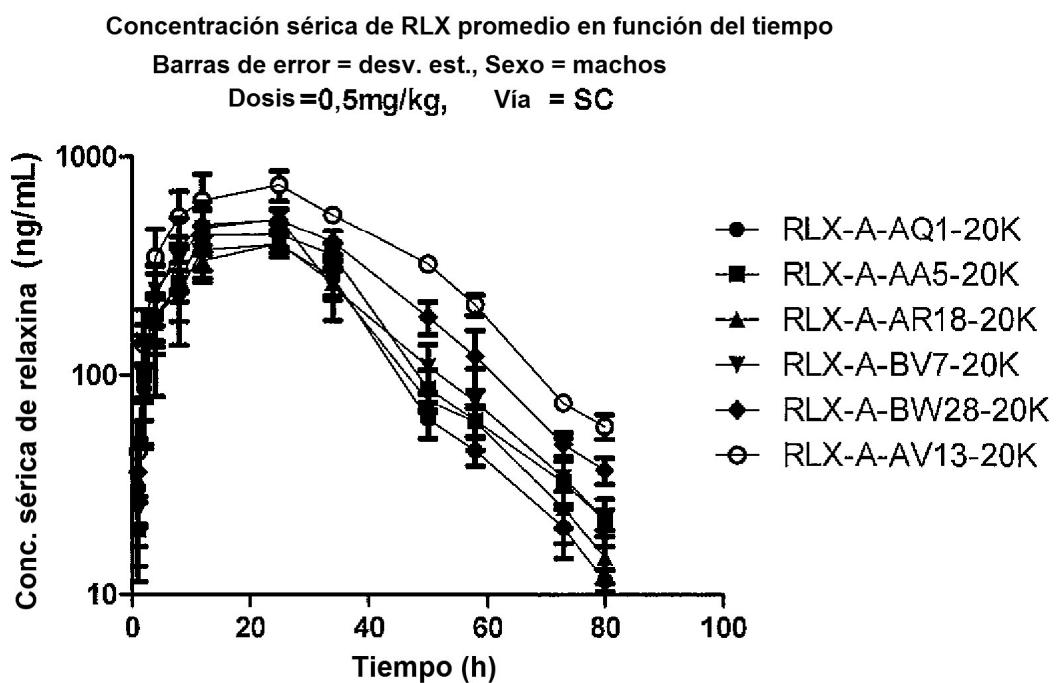


Figura 8B

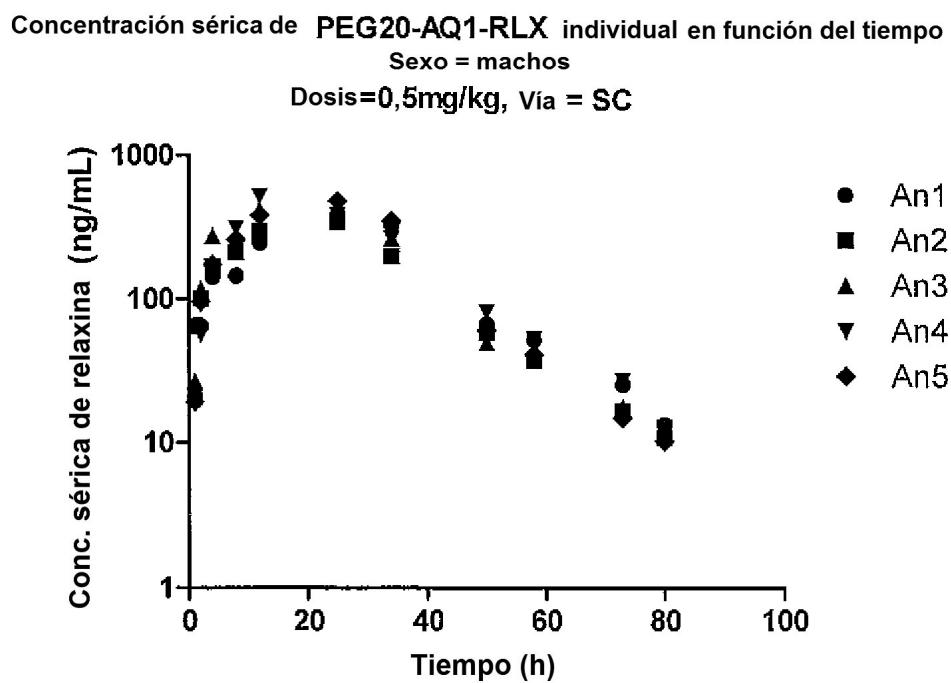


Figura 9A

Concentración sérica de **PEG20-AA5-RLX** individual en función del tiempo
 Sexo = machos
 Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

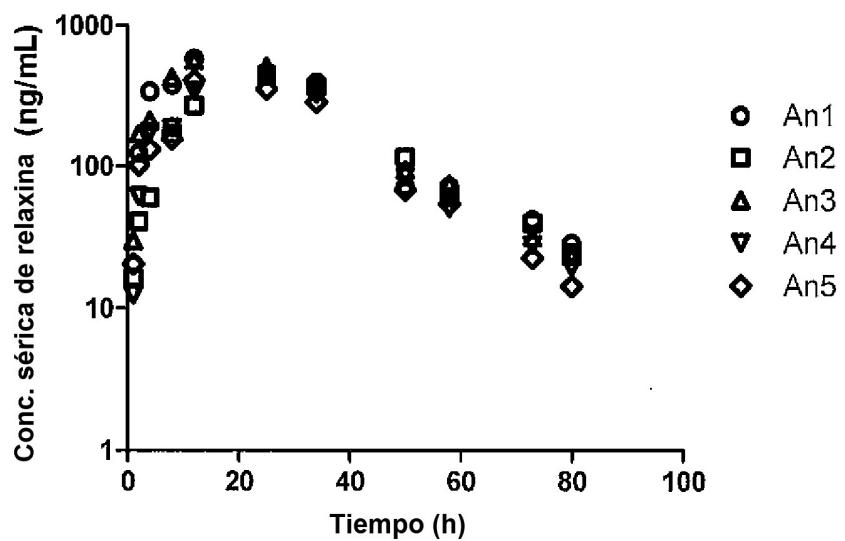


Figura 9B

Concentración sérica de **PEG20-AR18-RLX** individual en función del tiempo
 Sexo = machos
 Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

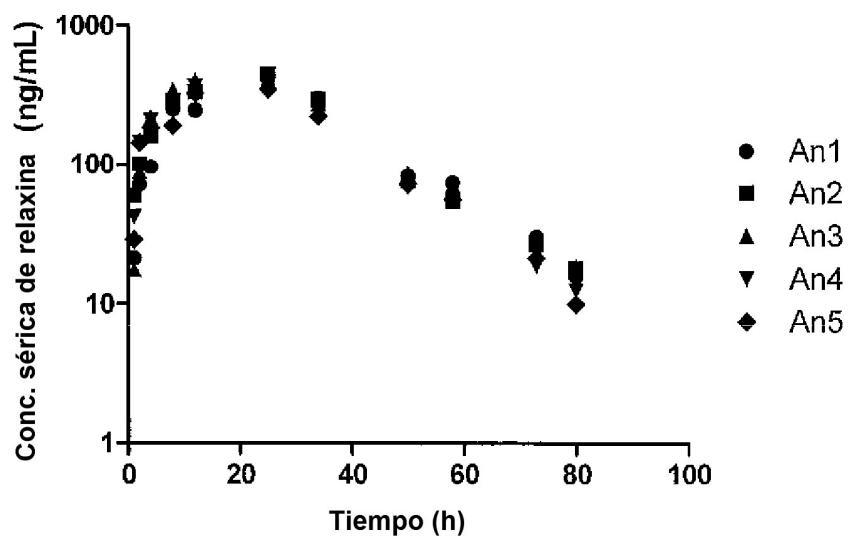
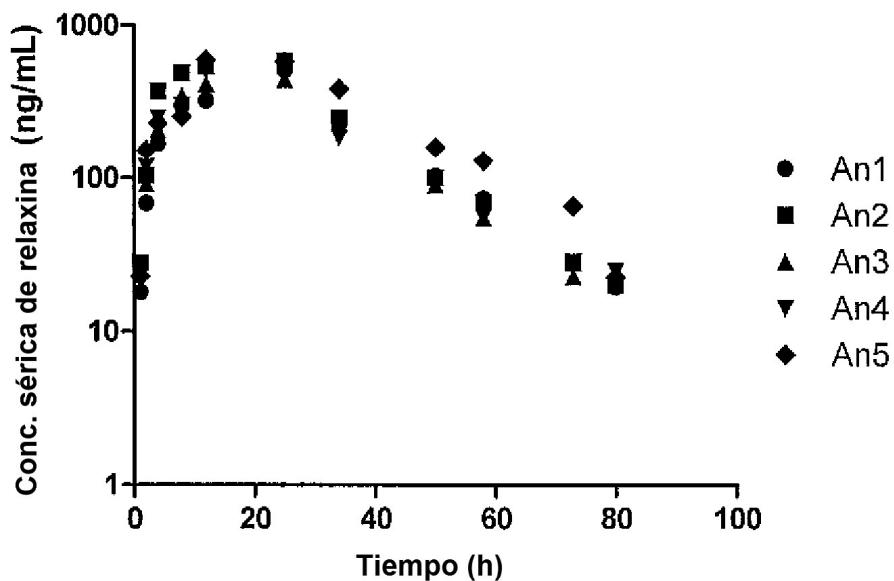


Figura 10AConcentración sérica de **PEG20-BV7-RLX** individual en función del tiempo

Sexo = machos

Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

**Figura 10B**Concentración sérica de **PEG20-BW28-RLX** individual en función del tiempo

Sexo = machos

Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

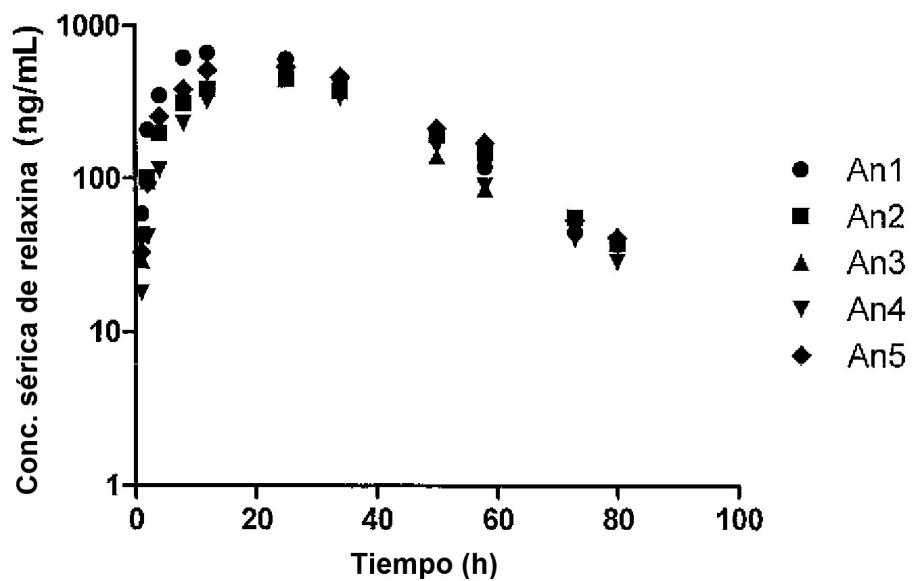


Figura 11

Concentración sérica de **PEG20-AV13-RLX** individual en función del tiempo

Sexo = machos

Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

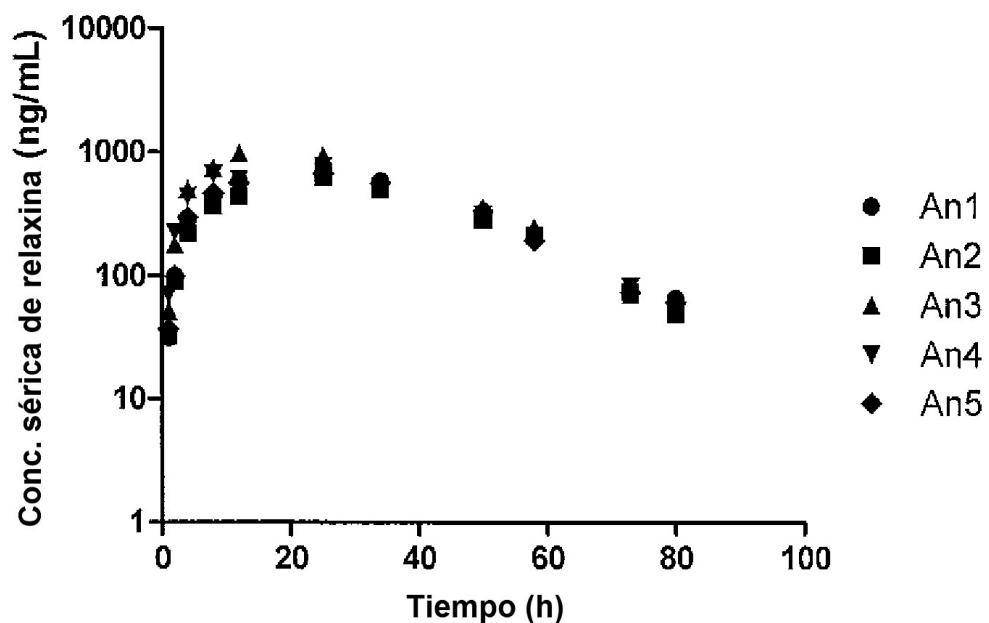
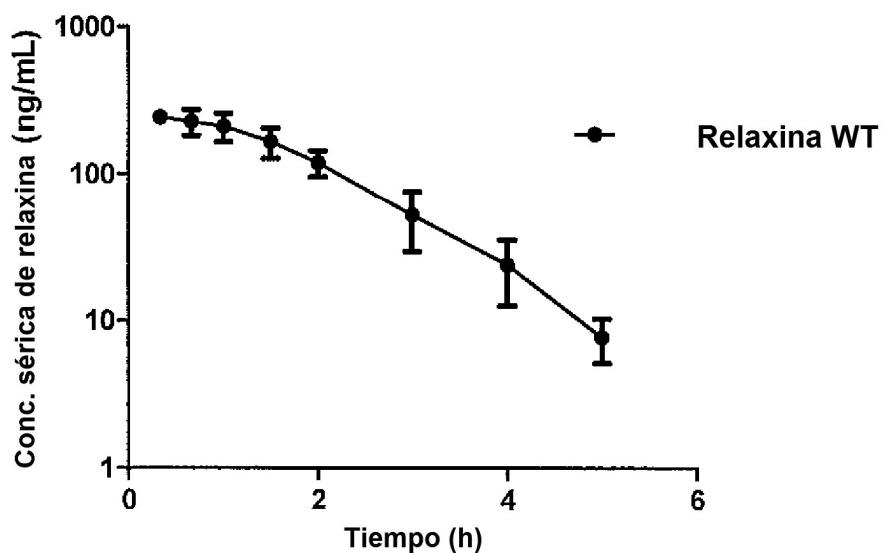


Figura 12A

Concentración sérica de RLX promedio en función del tiempo

Barras de error = desv. est., Sexo = machos

Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

**Figura 12B**

Concentración sérica de relaxina rh wt individual en función del tiempo

Sexo = machos

Dosis=0,5mg/kg, Vía = SC

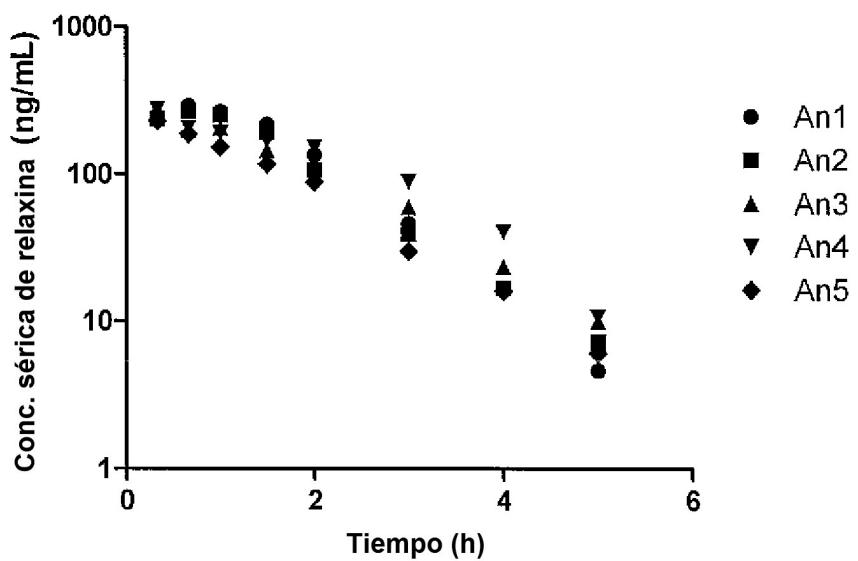


Figura 13A

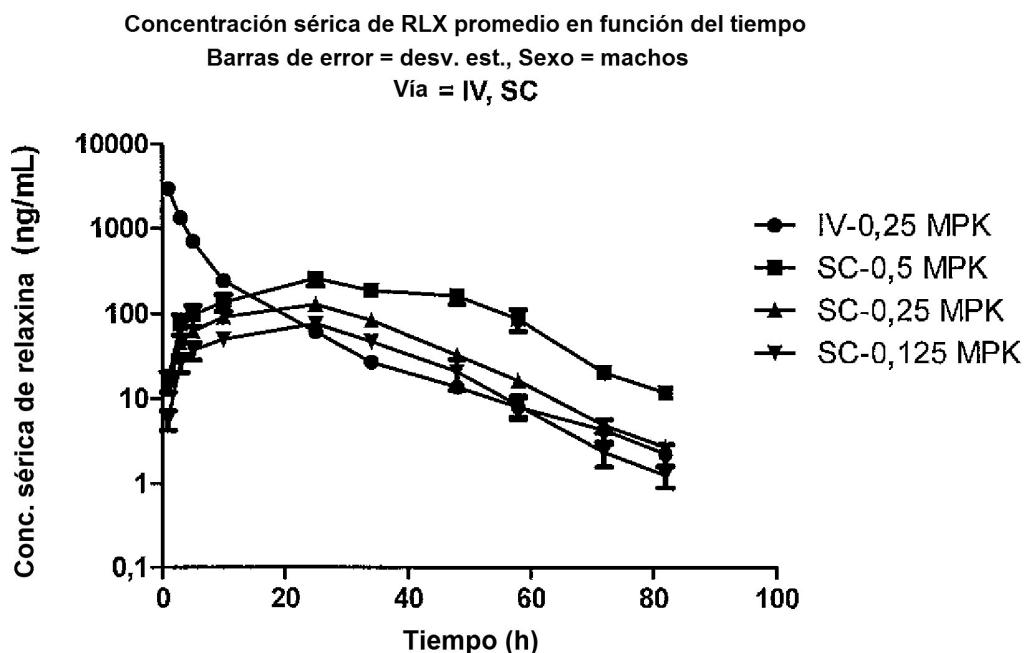


Figura 13B

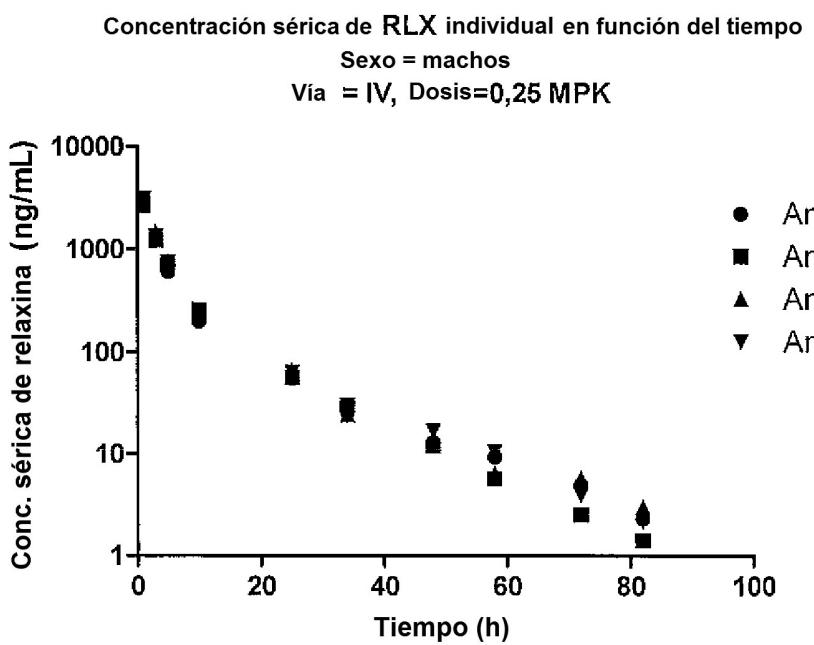


Figura 14A

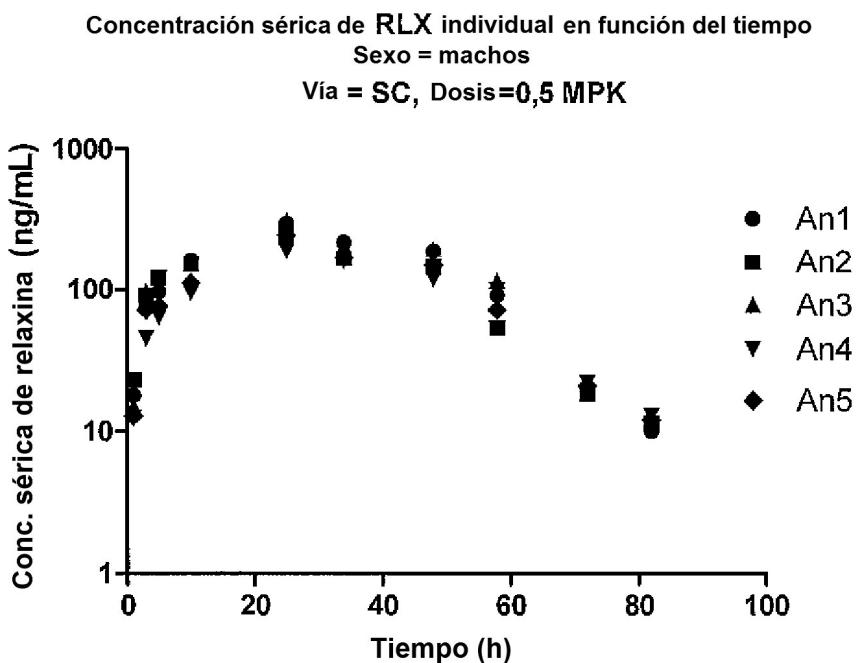


Figura 14B

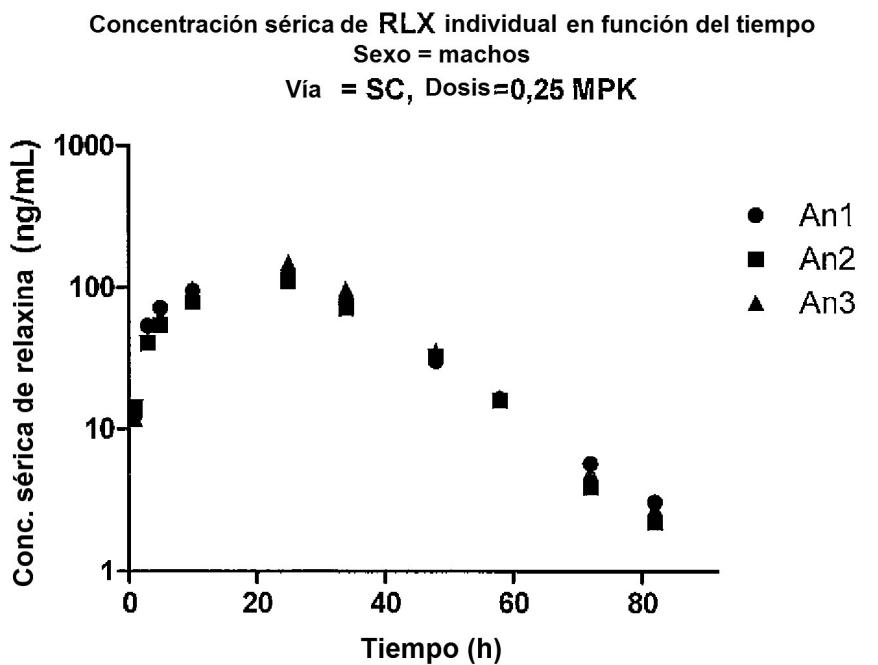


Figura 15

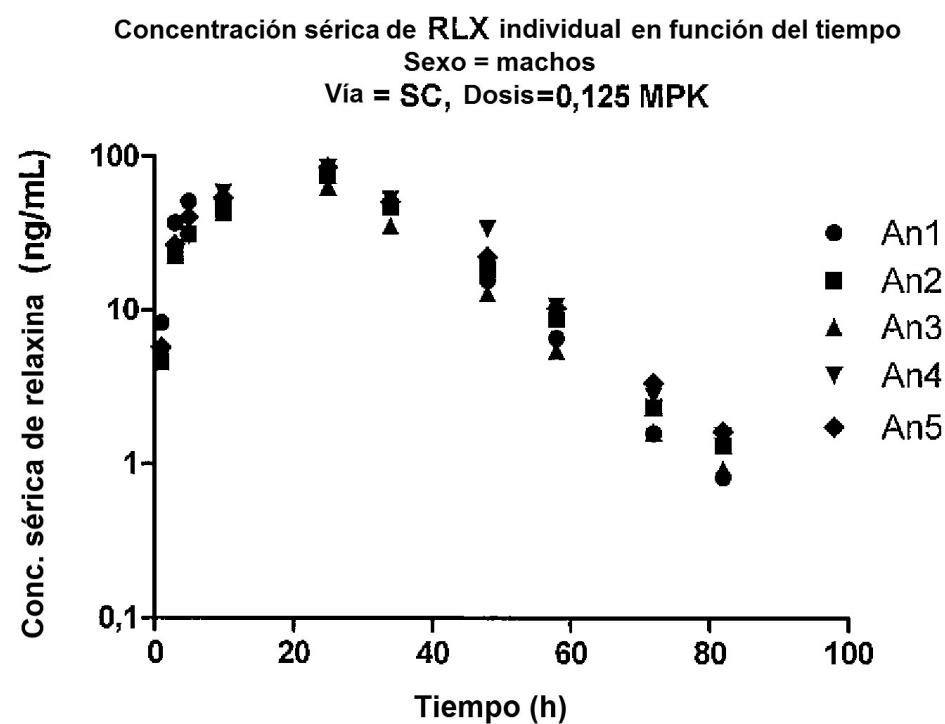


Figura 16A

Valores promedio de vida media terminal en función de la dosis

Barras de error = desv. est.

Vía = SC, Sexo = machos

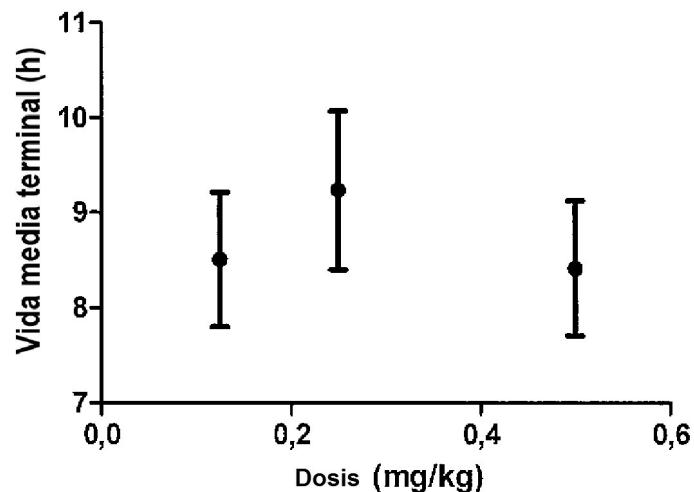


Figura 16B

AUCinf promedio en función de la dosis

Barras de error = desv. est. , Vía = SC

Especie = ratas SD, Sexo = machos

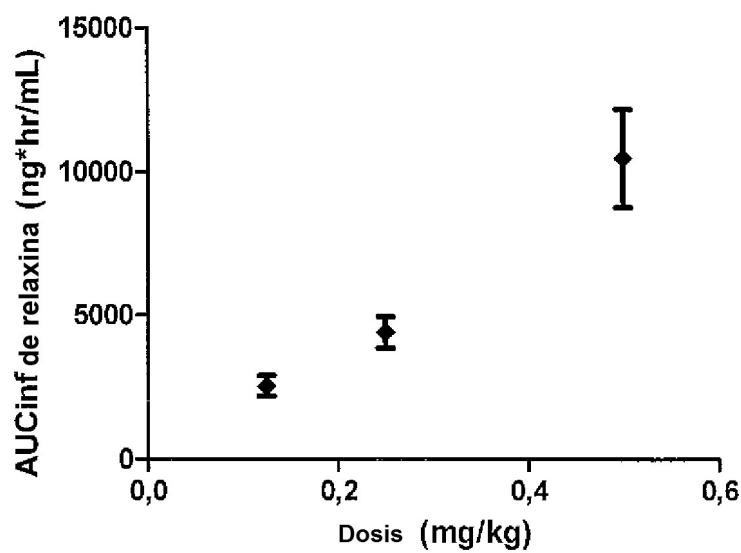


Figura 17A

C_{max} promedio en función de la dosis
Barras de error = desv. est., Vía =SC
Especie = ratas SD, Sexo = machos

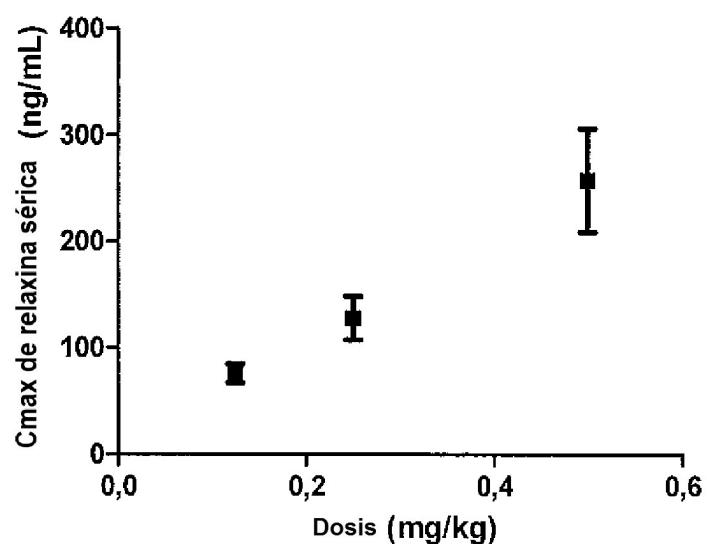


Figura 17B

Eliminación promedio en función de la dosis
Barras de error = desv. est., Vía =SC
Especie = ratas SD, Sexo = machos

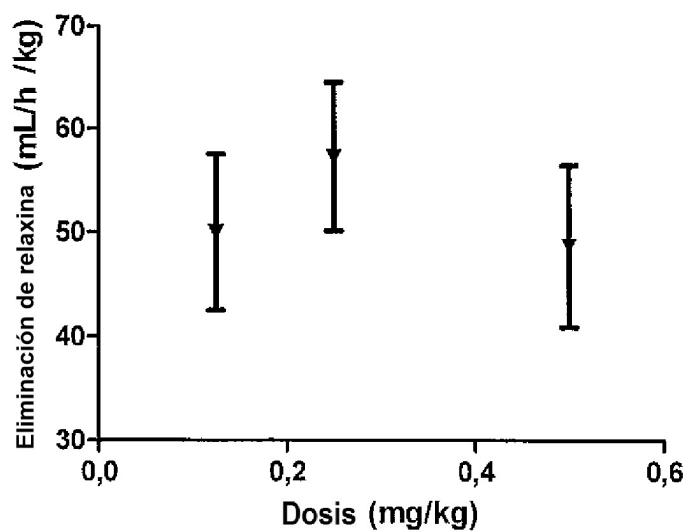
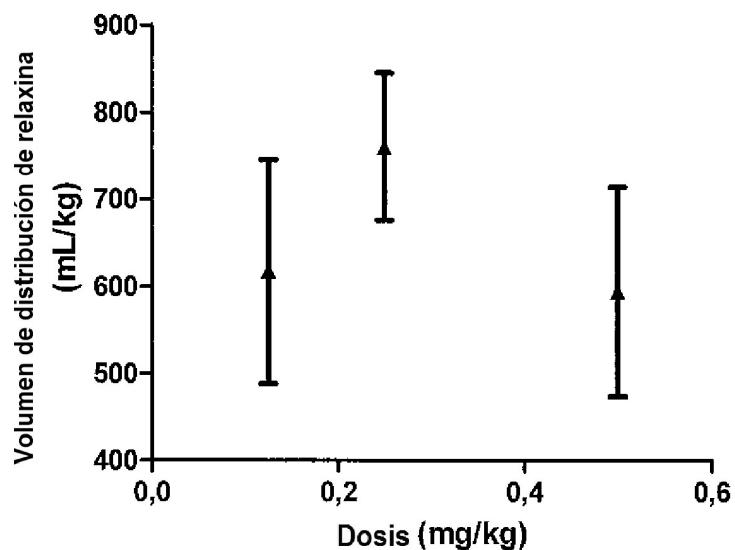


Figura 18A

Valores promedio de volumen de distribución en función de la dosis

Barras de error = desv. est.

Vía =SC, Sexo = machos

**Figura 18B**

Concentración sérica de RLX promedio en función del tiempo

Barras de error = desv. est., Sexo = machos

Símbolos abiertos=IV, Símbolos cerrados=SC

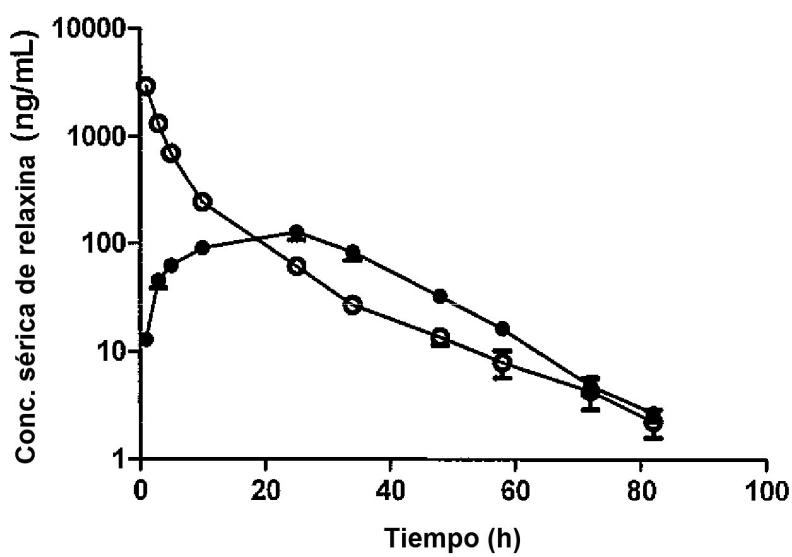


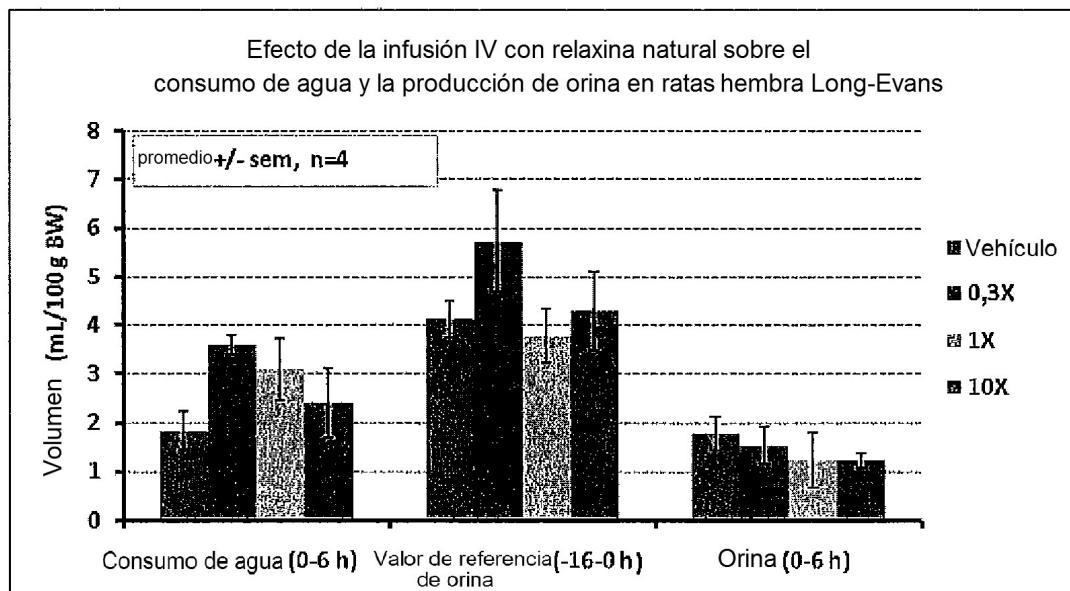
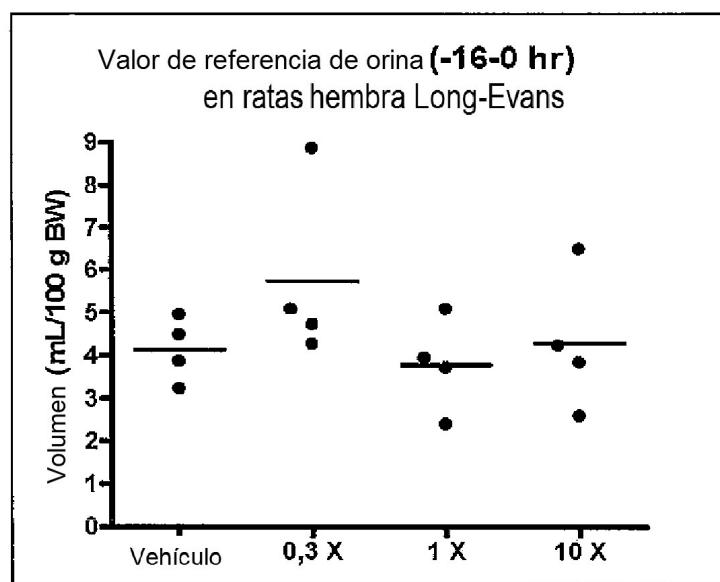
Figura 19, parte A**Figura 19, parte B**

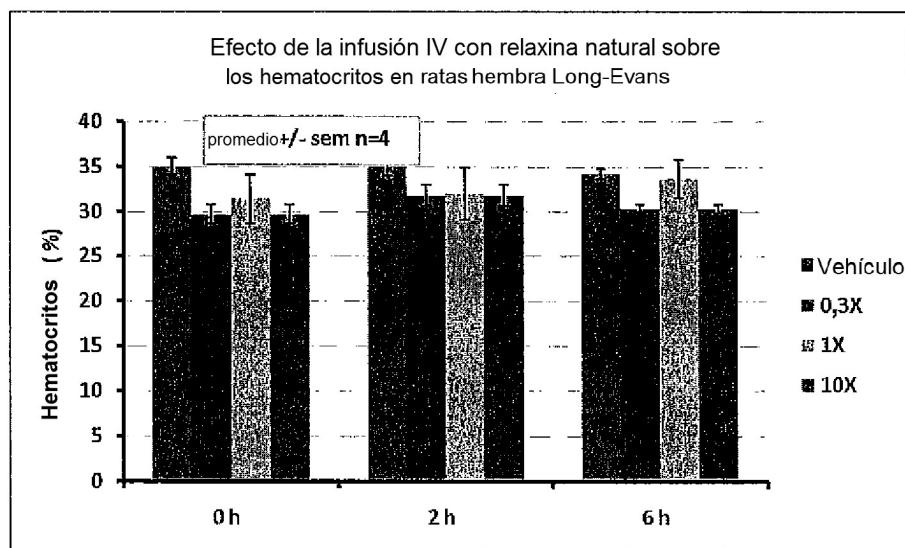
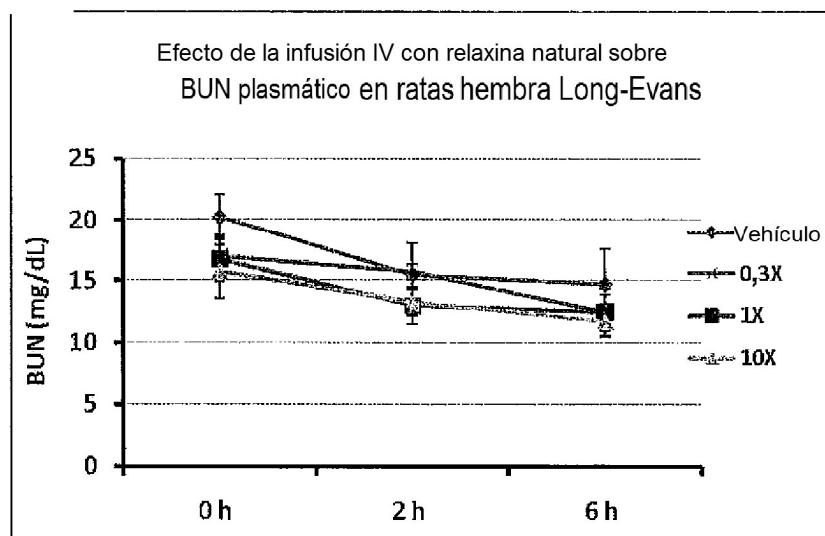
Figura 19, parte C**Figura 19, parte D**

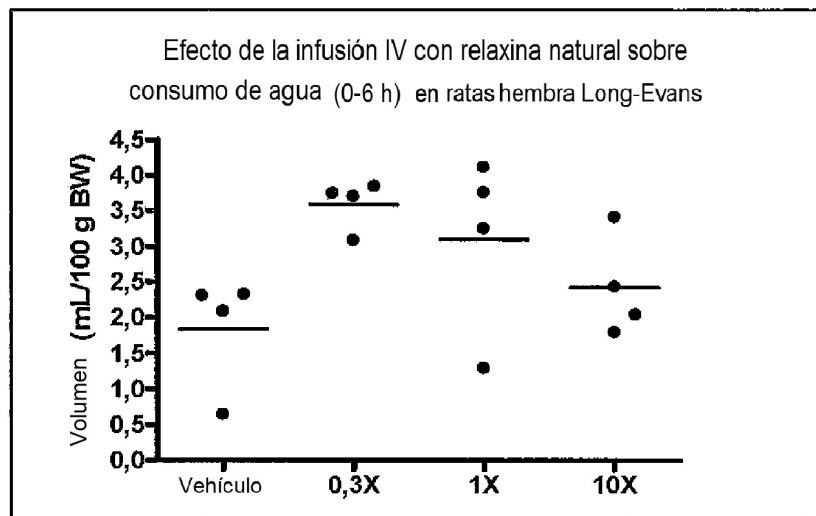
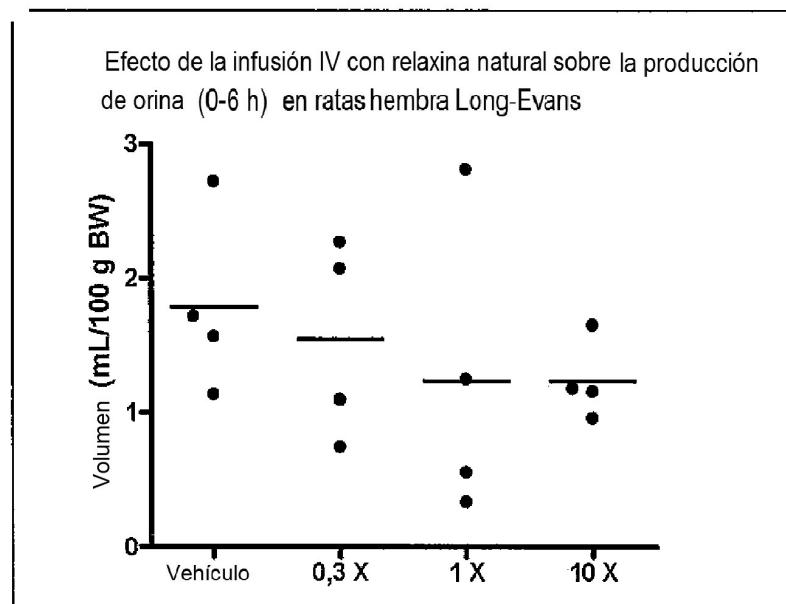
Figura 19, parte E**Figura 19, parte F**

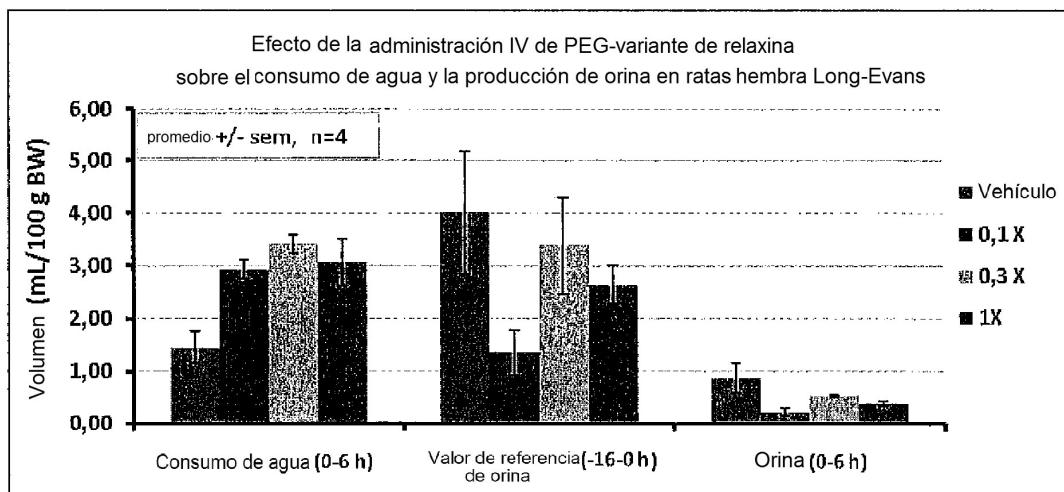
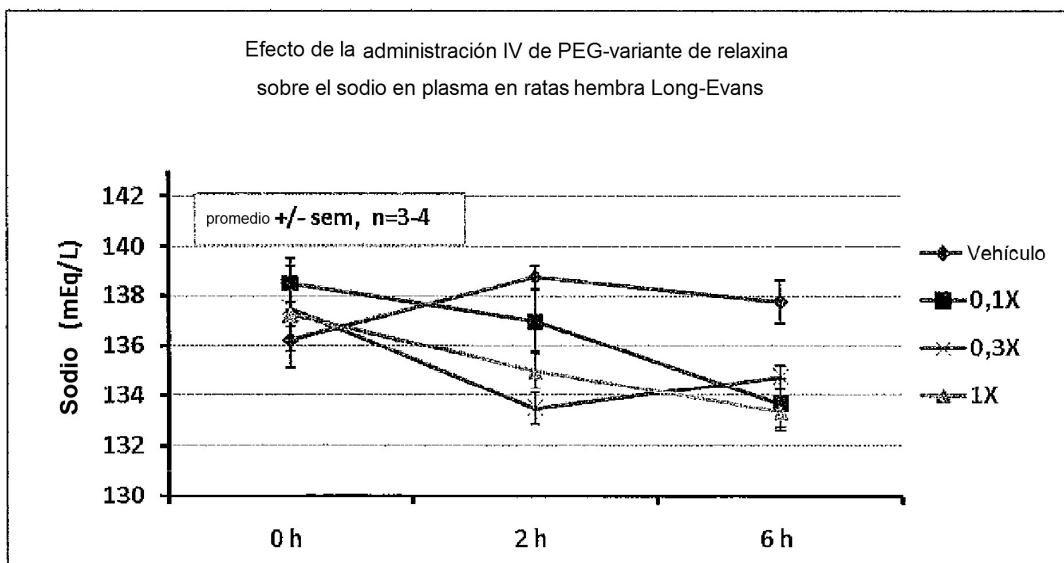
Figura 20, parte A**Figura 20, parte B**

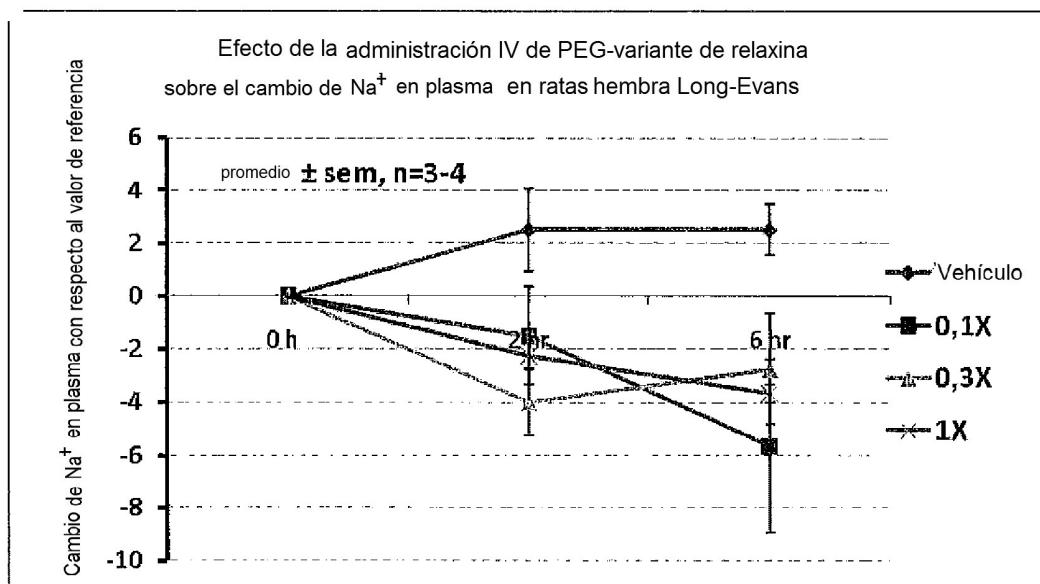
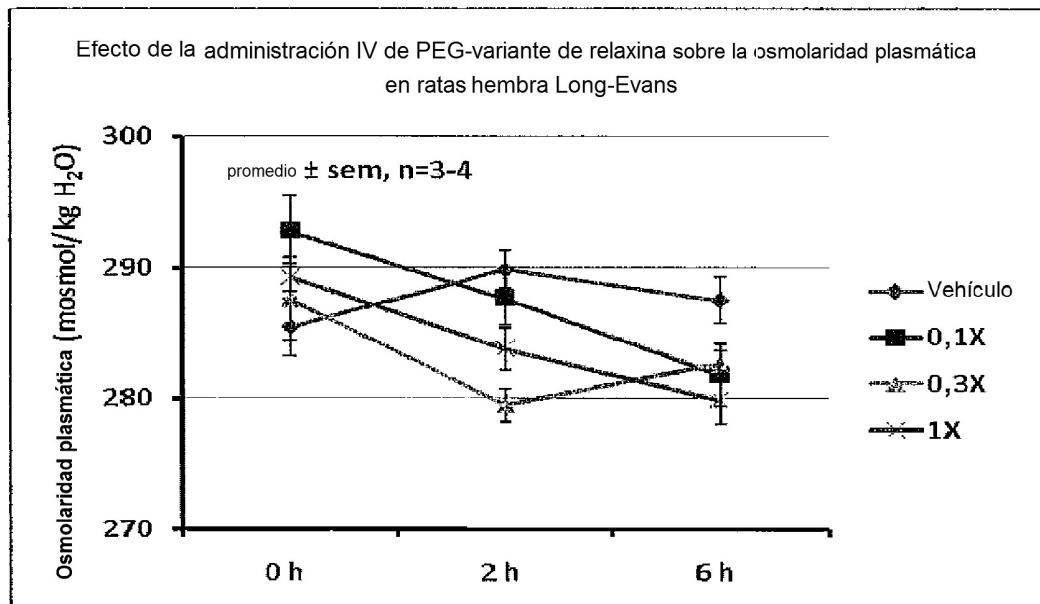
Figura 20, parte C**Figura 20, parte D**

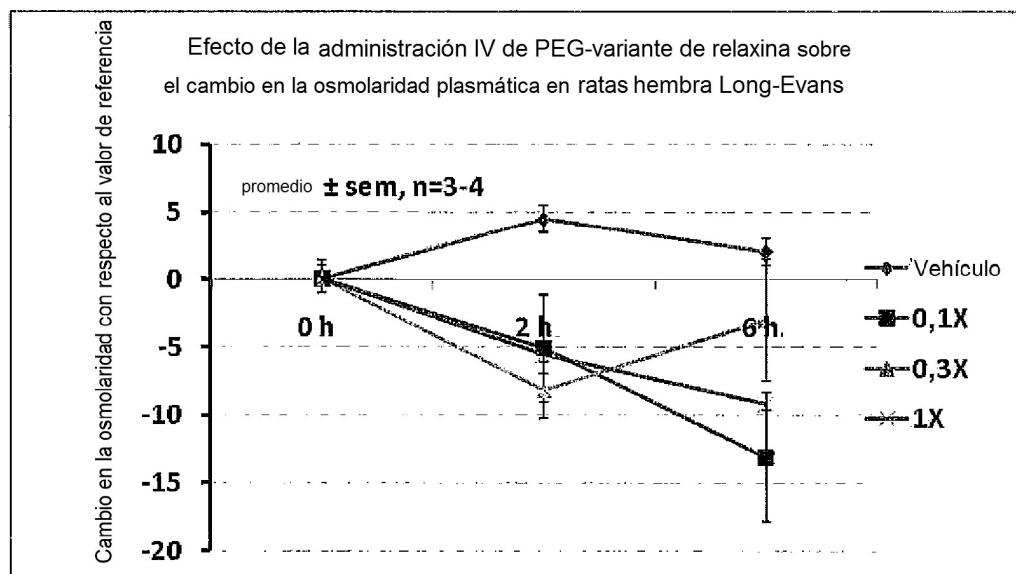
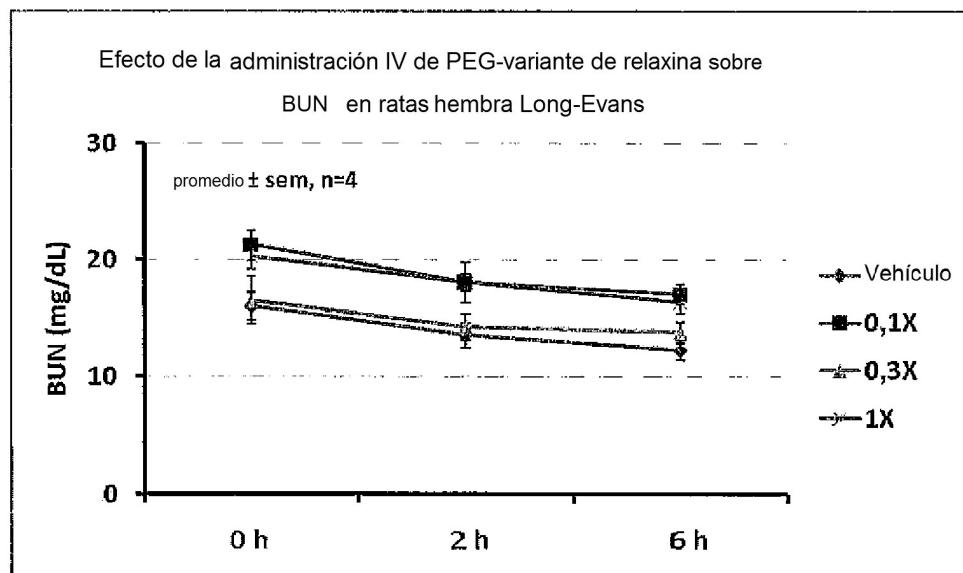
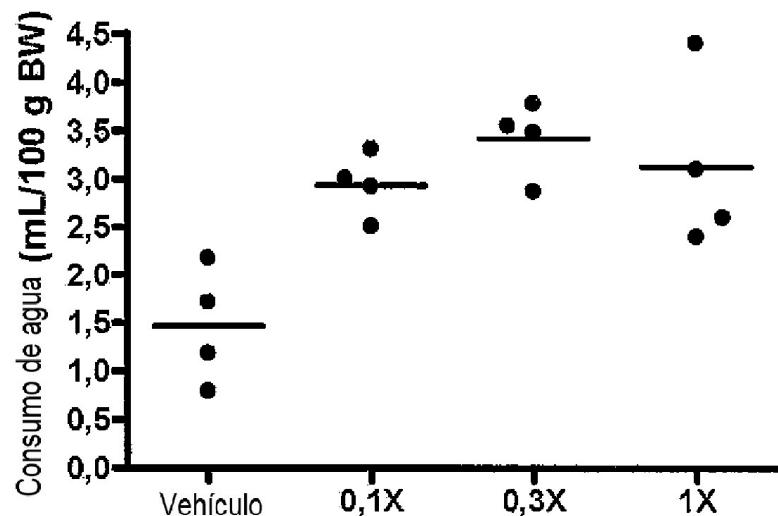
Figura 20, parte E**Figura 20, parte F**

Figura 20, parte G

Efecto de la administración IV de PEG-variante de relaxina sobre consumo de agua (0-6 h) en ratas hembra Long-Evans

**Figura 20, parte H**

Valor de referencia de producción de orina (-16-0h) en ratas hembra Long-Evans

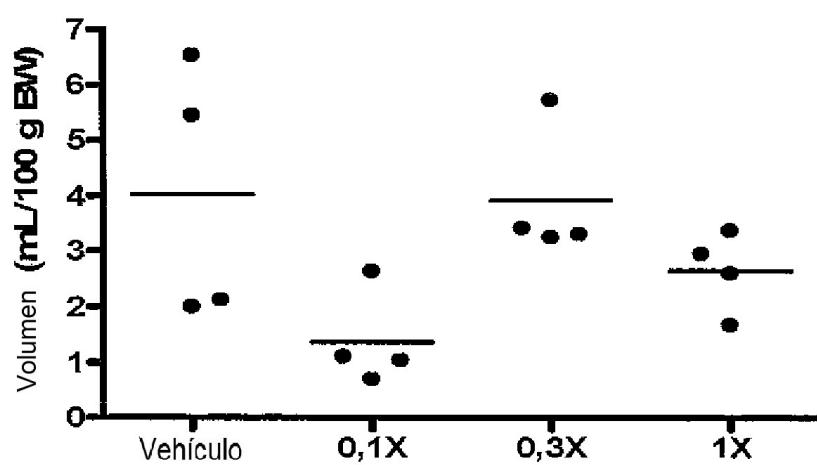


Figura 20, parte I

Efecto de la administración IV de PEG-variante de relaxina sobre la producción de orina (0-6 h) en ratas hembra Long-Evans

