Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025250 00000000 Folios: 120
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:28:31
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

00 25250

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social: **ABBOTT LABORATORIES** una sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

No. de Identificación:

Representante Legal (Persona Jurídica): JOSE ANTONIO LLOREDA

País de Domicilio: Estadoss Unidos de America

Departamento o Estado: Illinois

Dirección: 100 Abbott Park Road Abbott Park, Illinois 60064-6050 Estados Unidos de America.

Ciudad: Abbott Park Teléfono 847 937-4395

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección y Domicilio: Calle 72 No. 5-83 Piso 6, Santafé de Bogotá, Colombia

Ciudad: Teléfono

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es): Stephen W. Fesik y David J. Augeri.

Identificación:

Dirección: 1099 Portsmouth Circle Gurnee, IL 60031 y 45 Powell Road Emerson, NJ 07630, Estados Unidos de América.

Ciudad: Gurnee y Emerson Teléfono 847 937-4395

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención: **"PROTEINAS Y AMINO ACIDOS DE SITIO ESPECIFICO, MARCADOS ISOTOPICAMENTE Y PRECURSORES BIOQUIMICOS RESULTANTES"**

PRIORIDAD REIVINDICADA SI [X] NO [ ] **TIPO DE PRIORIDAD** ANDINA [ ] UNIONISTA [X]

(33) País US (32) Fecha 09-04-99 (31)No. Solicitud 09/289.517

Para Publicar a los [ ] **6 meses** [ ] **12 meses** [ ] **18 meses a partir de la fecha de la presente Solicitud**

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A 61 K 31/195 // 38/16; C12N 15/00

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Se presentan valina, leucina e isoleucina de sitio específico, marcados isotópicamente y precursores biosintéticos para estos amino ácidos. Los amino ácidos están marcados con 13C o 14C en el átomo(s) de carbono del grupo metilo más alejado al grupo carboxilo. También se revelan los precursores bioquímicos de estos amino ácidos marcados, ácido 2-ceto-4-(nC)- butírico y ácido 2-ceto-3-(nC-metil)-4-(nC)- butírico en los cuales n, en cada ocurrencia, es 13 ó 14.

También se revelan proteínas, fragmentos de proteínas y polipéptidos que contienen estos amino ácidos de sitio específico marcados isotópicamente, y los métodos para la preparación de los precursores bioquímicos, los amino ácidos y las proteínas, fragmentos de proteínas y polipéptidos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mensión de su protocolización ante la S.I.C. 11.700	☒
Recibo de la tasa respectiva **$608.000.oo**	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia dela primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista: SI	
Copia certificada de la primera solicitud: US 09/289.517	☒
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción Simple de María Mercedes Uricoechea.	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms. Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐
Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería	☒

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCIÓN Y DECLARO QUE LA INVENCIÓN ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSE ANTONIO LLOREDA C.C. 17.159.681 de Bogotá TP No. 10.784

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025250 00000000 Folios: 120
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:28:31
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
NIT : Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 19,989
FECHA : MARZO 27 DE 2000

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	1000341	7,446,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL : $	608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

a) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

   Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidas a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París —el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4--

b) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.

c) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud cuyas prioridades ahora reivindico, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 12 de la Decisión 344 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes de los Países Miembros del Acuerdo de Cartagena.

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 11.700. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

JOSE ANTONIO LLOREDA
T.P. No. 10.784
CODIGO 231

Proteínas y Amino Acidos de Sitio Específico, Marcados Isotópicamente y Precursores Bioquímicos Resultantes

Resumen: Objeto y Finalidad de la Invención

Se presentan valina, leucina e isoleucina de sitio específico, marcados isotópicamente y precursores biosintéticos para estos amino ácidos. Los amino ácidos están marcados con ^{13}C o ^{14}C en el átomo(s) de carbono del grupo metilo más alejado al grupo carboxilo. También se revelan los precursores bioquímicos de estos amino ácidos marcados, ácido 2-ceto-4-(^{n}C)- butírico y ácido 2-ceto-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)- butírico en los cuales n, en cada ocurrencia, es 13 ó 14.

También se revelan proteínas, fragmentos de proteínas y polipéptidos que contienen estos amino ácidos de sitio específico marcados isotópicamente, y los métodos para la preparación de los precursores bioquímicos, los amino ácidos y las proteínas, fragmentos de proteínas y polipéptidos.

Proteínas y Amino Acidos de Sitio Específico, Marcados Isotópicamente y Precursores Bioquímicos Resultantes

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con compuestos orgánicos de sitio específico isotópicamente marcados y los procesos para su preparación. Mas particularmente, la presente invención tiene que ver con precursores bioquímicos de sitio específico isotópicamente marcados de leucina, isoleucina y valina, los amino ácidos *per se*, proteínas, fragmentos de proteínas o polipétidos hechos a partir de allí isotópicamente marcados y los métodos relacionados para su preparación.

Antecedentes de la Invención

Una técnica recientemente desarrollada para el descubrimiento de guías para nuevas drogas involucra el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para descubrir compuestos que se unan a una molécula objetivo particular tal como una proteína (*ver*, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos: 5,698,401 y 5,804,390, a Fesik, *et. al.*). La técnica involucra la determinación de un plantilla espectro de correlación bi-dimensional $^{15}N/^{1}H$ por RMN de una proteína en la cual los sitios de átomos de hidrógeno han sido isotópicamente enriquecidos con ^{15}N. Este plantilla espectro de correlación es obtenido de la proteína en ausencia de cualquier

compuesto(s) ligando potencial. Luego, un compuesto ligando esperado, o una mezcla de dichos compuestos ligandos putativos, se mezcla con la proteína isotópicamente enriquecida, y se obtiene un segundo espectro de correlación por RMN. Los dos espectros son comparados, y las diferencias entre los dos espectros suministran información acerca de 1) la existencia de enlace entre un ligando cualquiera y la proteína anfitriona, 2) el sitio(s) de enlace, y 3) la fuerza(s) del enlace.

La técnica descrita en Fesik, *et. al., supra* emplea moléculas objetivo que han sido isotópicamente enriquecidas con el núcleo spin ^{15}N detectable por RMN. Este método depende de la modificación genética de un microorganismo adecuado para expresar la proteína, fragmento de proteína o polipéptido deseado, seguido de un cultivo del microorganismo modificado en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno las cuales incluyen nutrientes marcados ^{15}N. Las sales de amonio ^{15}N comparativamente más económicas y comercialmente disponibles, suministran la fuente ^{15}N.

Sin embargo, la aplicación de esta técnica de descubrimiento de drogas por RMN en moléculas objetivo isotópicamente enriquecidas con ^{13}C ha sido entorpecida por dos inconvenientes. Primero, es comparativamente costoso producir moléculas objetivo enriquecidas con ^{13}C en cualquier cantidad útil. Por ejemplo, la producción de proteínas mediante microorganismos genéticamente modificados crecidos en un medio nutriente que contiene glucosa uniformemente marcada (Glucosa-^{13}C), comercialmente disponible es costoso. Al momento de hacer esta solicitud, el costo de la glucosa-^{13}C era aproximadamente de $480/g. Alternativamente, la producción de proteínas marcadas ^{13}C mediante la inclusión de amino ácidos marcados ^{13}C uniformemente en un medio nutriente es similarmente

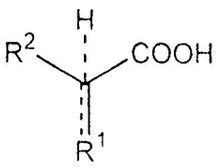
costoso. Segundo, las biomoléculas producidas usando glucosa-$^{13}C_6$ o de amino ácidos uniformemente enriquecidos con ^{13}C, comercialmente disponibles no es idealmente adecuada para la técnica de espectro de correlación por RMN. Las biomoléculas expresadas mediante microorganismos cultivados en un medio nutriente que contiene materiales de inicio uniformemente enriquecidos con ^{13}C contienen átomos adyacentes de carbono marcados ^{13}C. Debido a que la técnica RMN depende de la detección de acoplamiento de spin espacial (p.e. el efecto nuclear Overhauser, el acoplamiento relativamente fuerte de spin-spin de los núcleos ^{13}C adyacentes interfiere con la observación deseada. Existe, pues, una necesidad para el desarrollo de amino ácidos, proteínas y polipéptidos de sitio específicamente enriquecidos con ^{13}C.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona precursores bioquímicos de los amino ácidos leucina, isoleucina y valina de sitio específico isotópicamente enriquecidos, así como también amino ácidos *per se* de sitio específico isotópicamente enriquecidos. Adicionalmente, también se suministran las proteínas, fragmentos de proteína y polipéptidos que contienen residuos de aminoacilo de sitio específico isotópicamente enriquecido derivados de estos amino ácidos, y los métodos para su producción. Los amino ácidos y los precursores de amino ácidos biosintéticos son isotópicamente enriquecidos con ^{13}C o ^{14}C en los átomos de carbono de los grupos metilo más alejados de su grupo carboxilo. En los amino ácidos marcados de la presente invención, los átomos de carbono no adyacentes son marcados. En el caso donde la marca es ^{13}C, los amino ácidos de esta invención son, pues, idealmente

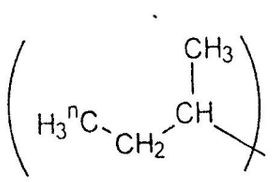
adecuados para el uso con la técnica de descubrimiento de drogas por RMN, ya que no hay interferencia con las señales deseadas por la interacción de spin-spin ^{13}C-^{13}C de los átomos adyacentes Además, debido a que los amino ácidos son marcados sólo en los grupos metilo, los tres átomos de hidrógeno magnéticamente equivalentes del grupo(s) metilo producen fuertes señales de RMN para la observación de cualquier efecto de acoplamiento con el átomo(s) ^{13}C a que están unidos.

Especificamente, la presente invención suministra compuestos de la fórmula I



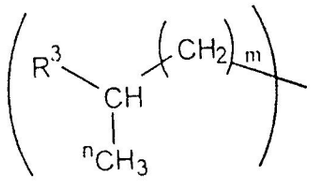
I

o la sal resultante, donde R^1 es oxígeno o NH_2, y R^2 es seleccionada entre un grupo consistente en:



A

y



B

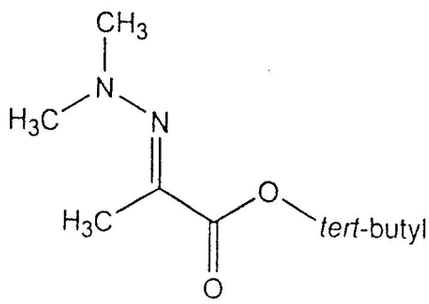
En las fórmulas presentadas arriba, R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$, las uniones de línea punteada representan enlaces de valencia, m es cero o uno, y n, en cada ocurrencia, es 13 ó 14, con las condiciones de que: a) cuando R^1 es NH_2, el segundo enlace de valencia representado por el enlace de línea punteada a R^1 está ausente y el hidrógeno unido al enlace de línea punteada está presente; b) cuando R^1 es oxígeno, el segundo enlace de valencia representado por el enlace de línea punteada a R^1 está presente y el átomo de hidrógeno unido al enlace de línea punteada está ausente; c) cuando R^1 es oxígeno, R^2 es B y m es cero; y d) cuando R^1 es NH_2, R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$.

La presente invención provee los amino ácidos de sitio específico enriquecidos con ^{13}C y ^{14}C, isoleucina (fórmula I arriba donde R^1 es amino, R^2 es A); leucina (fórmula I arriba donde R^1 es amino, R^2 es B, R^3 es $^nCH_3$, y m es uno), y valina (fórmula I arriba donde R^1 es amino, R^2 es B, R^3 es $^nCH_3$, y m es cero), y los precursores bioquímicos de sitio específico enriquecidos con ^{13}C- y ^{14}C- de estos amino ácidos, ácido 2-ceto-4-(^nC)-butírico (fórmula I arriba donde R^1 es oxígeno, R^2 es B, m es cero, y R^3 es hidrógeno) y ácido 2-ceto-3-(^nC-metil)-4-(^nC)-butírico (fórmula I arriba donde R^1 es oxígeno, R^2 es B, m es cero, y R^3 es $^nCH_3$). De aquí en adelante, n representa tanto 13 (p.e. compuestos enriquecidos con ^{13}C) como 14 (p.e., compuestos enriquecidos con ^{14}C).

La presente invención además proporciona proteínas, fragmentos de proteína y polipéptidos que contienen residuos aminoacilo derivados de uno o más de los amino ácidos seleccionados entre un grupo consistente en ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)- pentanóico; ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{14}C)-pentanóico; L-2-amino-4-(^{13}C-metil-5-(^{13}C)-

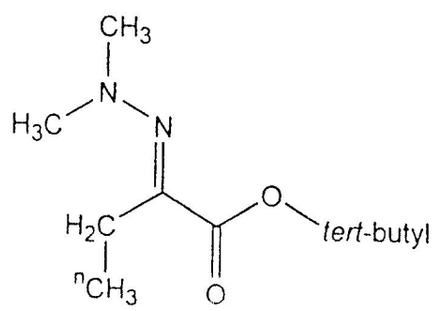
pentanóico; ácido L-2-amino-4-(^{14}C-metil-5-(^{14}C)-pentanóico; ácido L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- butanóico; y ácido L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- butanóico.

También se presentan por parte de la presente invención, métodos químicos para preparar los ácidos precursores bioquímicos de sitio específico marcados ^{13}C y ^{14}C, ácido 2-ceto-4-(^{n}C)-butírico y ácido 3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-butírico o las sales resultantes, las cuales involucran la reacción de un compuesto de fórmula IV



IV

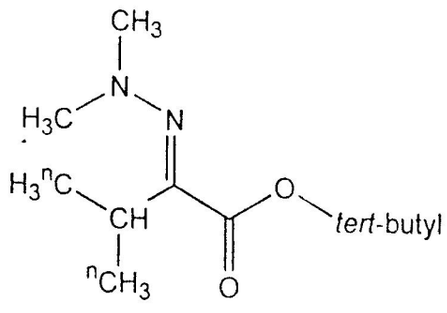
con yoduro de metilo isotópicamente marcado (H_3CI) para producir un compuesto de la fórmula V



V;

retirando los grupos protector éster *terc*-butil y dimetilhidrazino de un compuesto de fórmula V para producir ácido 2-ceto-4-(^{n}C)- butírico; o posteriormente reaccionando un compuesto de fórmula V con yoduro

de metilo isotópicamente marcado (H_3CI) donde n es 13 ó 14, para producir un compuesto de la fórmula VI



VI;

removiendo los grupos protectores éster *terc*-butilo y dimetilhidrazino de un compuesto de fórmula V para producir ácido 2-ceto-3-(^{n}C-metil)-4-^{n}C- butírico; y opcionalmente convirtiendo los productos en sales.

La presente invención adicionalmente suministra métodos para preparar los amino ácidos de sitio específico marcados ^{13}C y ^{14}C, leucina, isoleucina y valina. El proceso involucra la modificación genética de un microorganismo para expresar un polipéptido que contiene un amino ácido seleccionado entre leucina, isoleucina, valina y las mezclas resultantes; cultivar el microorganismo modificado en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno que incluyen producir ácido 2-ceto-4-(^{n}C)- butírico, ácido 2-ceto-3-(^{n}C-metil)-4- ^{n}C- butírico, y las sales y mezclas resultantes, aislar el polipéptido expresado resultante; y fragmentar el polipéptido y aislar los amino ácidos individuales. El polipéptido expresado se fragmenta por medio de métodos convencionales conocidos en el arte, incluyendo hidrólisis o clivaje enzimático.

El resultado de un amino ácido particular puede ser maximizado y el costo minimizado mediante la modificación del microorganismo anfitrión para expresar un homopolímero del amino ácido, y utilizando el precursor biosintético isotópicamente enriquecido adecuado en el medio nutriente.

La presente invención además suministra un método para preparar una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contienen residuos de aminoacilo derivados de los amino ácidos seleccionados entre le grupo consistente en ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)- pentanóico; ácido L-2-amino -3-metil-5-(^{14}C)-pentanóico; L-2-amino-4-(^{13}C-metil-5-(^{13}C)-pentanóico; ácido L-2-amino-4-(^{14}C-metil-5-(^{14}C)- pentanóico; ácido L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- butanóico; y ácido L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- butanóico, el cual involucra la modificación genética de un microorganismo para expresar una proteína, fragmento de proteína o polipéptido predeterminado; cultivar el microorganismo modificado en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno el cual incluye ácido 2-ceto-4-(^{n}C)- butírico, ácido 2-ceto-3-(^{n}C-metil)-4-^{n}C-butírico, y las sales y mezclas resultantes, y aislar el polipéptido expresado resultante.

Descripción Detallada de la Invención

La abundancia isotópica natural de ^{13}C es 1.11%, y la de ^{14}C es negligentemente baja. Así la probabilidad de que cualquier átomo de carbono dado dentro de una molécula orgánica sea ^{13}C es normalmente aproximadamente 0.0111, y la probabilidad de que

cualquier átomo de carbono dado sea ^{14}C es muy baja. Cuando las proteínas objetivo son preparadas para uso en el "barrido" adaptado de RMN o en un proceso de descubrimiento de droga como describe Fesik, *et. al., supra*, se desea que la señal de RMN de ^{13}C sea aumentada incrementando el contenido natural de ^{13}C en la molécula objetivo que está siendo estudiada. Esto se logra enriqueciendo, ya sea uniformemente o selectivamente, la molécula objetivo con ^{13}C. Como se usa a lo largo de esta especificación y en las reivindicaciones anexas, los términos "enriquecimiento uniforme", "uniformemente enriquecedor", "uniformemente enriquecido", "marcación uniforme" y "marcado uniformemente" significan el incremento a un valor mayor que 0.0111, por medios sintéticos, la probabilidad de que un átomo de carbono, aleatoriamente seleccionado dentro de la molécula objetivo sea ^{13}C. Los términos "enriquecimiento específico"; "enriquecimiento de sitio específico"; "específicamente enriquecedor"; "específicamente enriquecido"; "específicamente marcando" y "marcado específicamente" significan incrementar a un valor mayor que 0.0111, por medios sintéticos, la probabilidad de que los átomos de carbono en uno o más sitios específicos preseleccionados dentro de la molécula objetivo, sean ^{13}C.

Por ejemplo, las biomoléculas expresadas por microorganismos biogenéticamente modificados cultivados en un medio nutriente que contiene glucosa uniformemente enriquecida con ^{13}C serán uniformemente enriquecidas. Una proteína expresada en un microorganismo biogenéticamente modificado cultivado en un medio nutriente que contiene un amino ácido que está enriquecido con ^{13}C únicamente en la cadena lateral de metilo será específicamente enriquecido por ^{13}C en los residuos alanil contenidos dentro de la proteína expresada. De igual manera, las proteínas expresadas por el método de esta invención serán específicamente enriquecidas en sitio

por ^{13}C o ^{14}C en los grupos metilo terminales de la cadena lateral de leucina, isoleucina y valina.

El método de la presente invención también permite la preparación de leucina, isoleucina, valina, proteínas, fragmentos de proteínas o polipéptidos de sitio específicamente marcados hechos de estos amino ácidos marcados y los precursores biosintéticos de amino ácidos marcados con ^{14}C así como con ^{13}C. Dichos componentes son útiles, por ejemplo, en estudios de metabolismo de proteínas donde se desea seguir el curso y el destino de la degradación de proteínas por métodos radiométricos.

Las reivindicaciones posteriores usadas a lo largo de esta especificación y las reivindicaciones anexas tienen sus significados normalmente aceptados. Los siguientes términos específicos tienen los siguientes significados:

"DTT" significa ditiotreitol

"HEPES" denota ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etilsulfónico.

"IPTG" significa isopropilo- β -D-tiogalactopiranosida

"PMSF" se refiere a α-floruro de toluenosulfonil

"SCD" se refiere a el dominio catalítico (residuos 81-256) de estromelisina.

La preparación de la molécula objetivo ejemplo de fragmento de proteína de sitio específico enriquecida con ^{n}C se presenta abajo. El ejemplo particular mostrado demuestra la preparación del llamado "dominio catalítico" de estromelisina humana ("SCD"), marcada con leucina, valina e isoleucina de sitio específico enriquecida con ^{13}C. Aunque se muestra con precursores de amino ácidos marcados con ^{13}C, el método es igual aplicable comenzando con precursores de

amino ácidos marcados con ^{14}C. Un medio preferido para preparar cantidades adecuadas de polipéptidos específicamente enriquecidos con ^{n}C que contengan las moléculas objetivo involucra la transformación de la célula anfitriona con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. La proteína o fragmento de proteína de polipéptido se expresa mediante el cultivo de la línea celular transformada en un medio que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno bien conocidos en el arte e incluyen los precursores bioquímicos enriquecidos con ^{n}C de esta invención. Para la marca de sitio específico de la proteína o fragmento de proteína de acuerdo con la presente invención, las fuentes asimilables para la marca ^{n}C de un polipéptido objetivo incluyen precursores biosintéticos de amino ácidos marcados con ^{n}C.

Por ejemplo, se sabe que el α-ceto- butirato es el precursor biosintético de la isoleucina y que α-ceto-isovalerato es el precuror biosintético tanto de la valina como de la leucina. El Esquema I abajo muestra como los precursores bioquímicos de leucina, isoleucina y valina específicamente enriquecidos con ^{n}C pueden ser sintetizados. El Esquema emplea el yoduro de metilo enriquecido con ^{n}C H_3CI, relativamente económico, como la fuente de enriquecimiento isotópico para producir ácido α–ceto- butírico y ácido α-ceto-isovalérico terminalmente marcado $^{13}C_6$.

El uso de un nutriente uniformemente enriquecido con ^{13}C tal como glucosa-$^{13}C_6$, ha sido normalmente usado como un medio conveniente para introducir el enriquecimiento de ^{13}C a la molécula objetivo; sin embargo, es muy costoso. Además, una gran mayoría de los sitios de carbono en los objetivos uniformemente marcados ^{13}C tendrán un vecino covalentemente enlazado el cual también está marcado ^{13}C, introduciendo un acople ^{13}C-^{13}C que puede impactar negativamente tanto a las propiedades señal-a-ruido y de relajación de los sitios

marcados ^{13}C en la biomolécula objetivo. Alternativamente, el medio nutriente puede incluir amino ácidos uniformemente marcados ^{13}C comercialmente disponibles. Aunque esta técnica reduce la "dilución" del marcado, también es una alternativa costosa y así mismo sufre de la acción de las interaccciones de spin-spin de ^{13}C-^{13}C de átomos de carbono adyacentes.

Sin embargo, el método de la presente invención para el marcado ^{13}C de una molécula objetivo de polipéptido comprende el cultivo de la línea celular genéticamente modificada en un medio nutriente que contiene precursores biosintéticos marcados ^{n}C de amino ácidos particulares. No sólo ciertos amino ácidos en la proteína, fragmento de proteína o polipéptido resultantes están isotópicamente enriquecidos, esos amino ácidos están específicamente marcados de sitio.

En un método de una realización de la invención, los precursores de amino ácidos preferidos son ácido α-ceto- butírico y ácido α-ceto-isovalérico marcados. Los productos biosintéticos de estos precursores son leucina, isoleucina y valina, en los cuales grupos metilo de cadenas laterales particulares están enriquecidos con ^{n}C. Debido a que los grupos metilo tienen cada uno tres átomos de hidrógeno conectados al átomo de carbono marcado ^{n}C, cuando n es 13, las señales de RMN correspondientes son particularmente fuertes y distintivas.

La síntesis para el ácido α-ceto-butírico y ácido α-ceto-isovalérico marcados involucra la C-metilación del átomo de carbono terminal en ácido pirúvico con yoduro de metilo enriquecido con ^{n}C. Normalmente, la alquilación de los ácidos α-ceto tales como piruvato es inherentemente difícil y está acompañado por la descomposición del enolato intermedio con la formación de numerosos productos laterales. Sin embargo, *Spencer, et al., Tetrahedron Letters 1975, 38-89 y*

Williams, et al., ibid., 1990, 5881 ha mostrado que la alquilación del enolato de oxima correspondiente ha sido realizada, aunque la alquilación con electrofilos primarios (por ejemplo, yoduro de metilo) fue problemática. *D. Enderes, et al., Agnew. Chem. Int. Eng. Ed.,* 1992, 618 y D. Enders, *et. al., Synlett,* 1992, 901 han demostrado que la alquilación de una N,N-dimetilhidrazona de piruvato es posible, pero se menciona específicamente que el voluminoso éster 2,6-dialquil fenil fue necesario para prevenir la auto acilación.

Compuestos representativos de la presente invención incluyen los siguientes:

ácido 2-ceto-4-(^{13}C)- butírico o la sal resultante;

ácido 2-ceto-4-(^{14}C)- butírico o la sal resultante;

ácido 2-ceto-3-(^{13}C-metil)-4-(^{13}C)- butírico o la sal resultante;

ácido 2-ceto-3-(^{14}C-metil)-4-(^{14}C)- butírico o la sal resultante;

ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)- pentanóico o la sal resultante;

ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{14}C)- pentanóico o la sal resultante;

ácido L-2-amino-4-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- pentanóico o la sal resultante;

ácido L-2-amino-4-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- pentanóico o la sal resultante;

ácido L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- butanóico o la sal resultante; y

ácido L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- butanóico o la sal resultante.

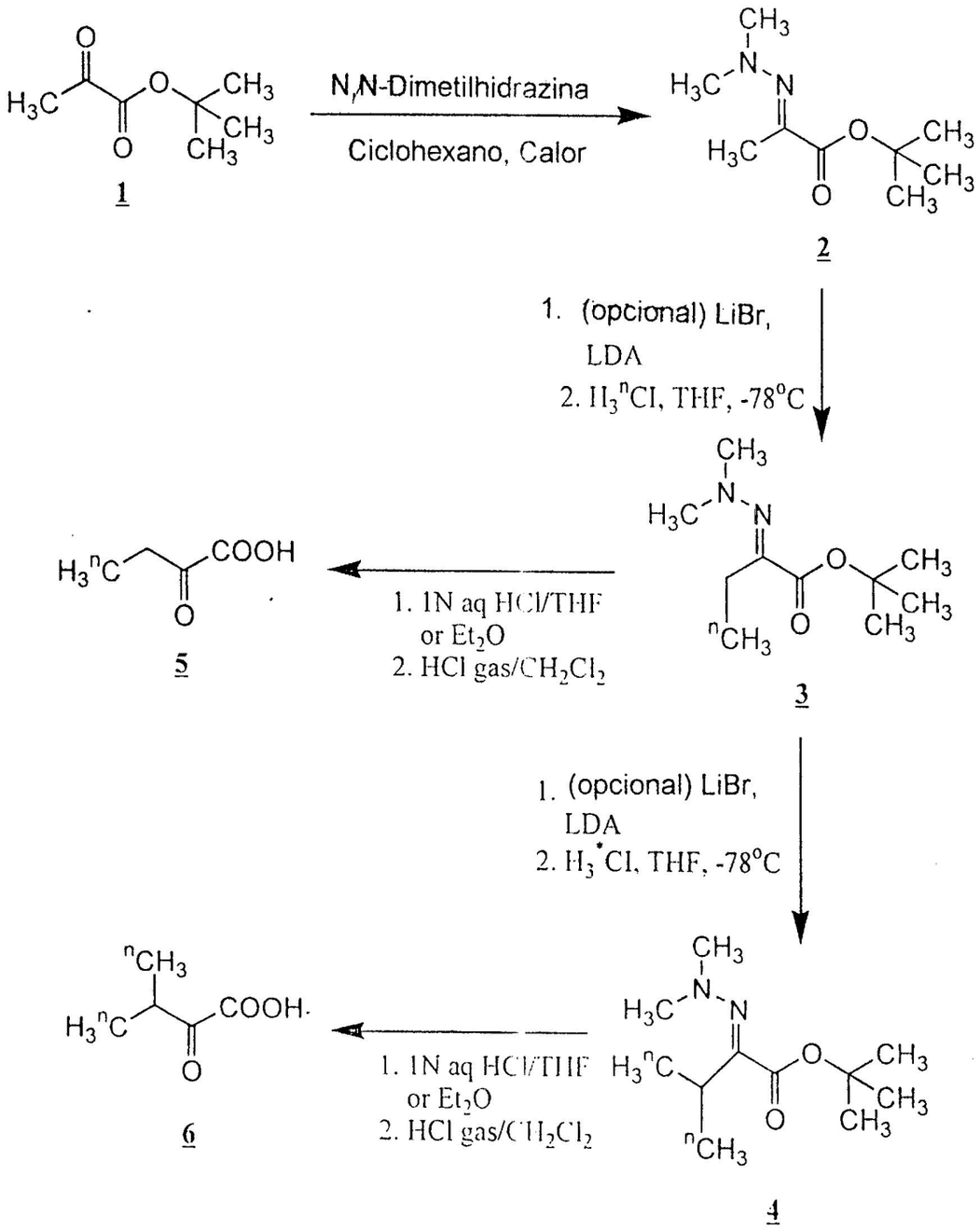
La presente invención adicionalmente abarca proteínas, fragmentos de proteína y polipéptidos que contienen los amino ácidos de sitio específico isotópicamente enriquecidos ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)- pentanóico;

ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{14}C)- pentanóico; L-2-amino-4-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- pentanóico; ácido L-2-amino-4-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- pentanóico; ácido L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- butanóico; y ácido L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- butanóico.

Aunque los compuestos específicos nombrados arriba han sido diseñados teniendo los isótopos ^{13}C- o ^{14}C- en sitios específicos en el compuesto, se debe entender por aquellos con habilidades ordinarias en el arte que los átomos de carbono en estos sitios en los compuestos no serán completamente marcados ^{13}C o ^{14}C. El grado de substitución isotópica o "enriquecimiento" en cada sitio molecular depende del grado correspondiente de enriquecimiento contenido en los materiales de inicio utilizados en la síntesis.

Esquema I

Síntesis Química de los Precursores Marcados

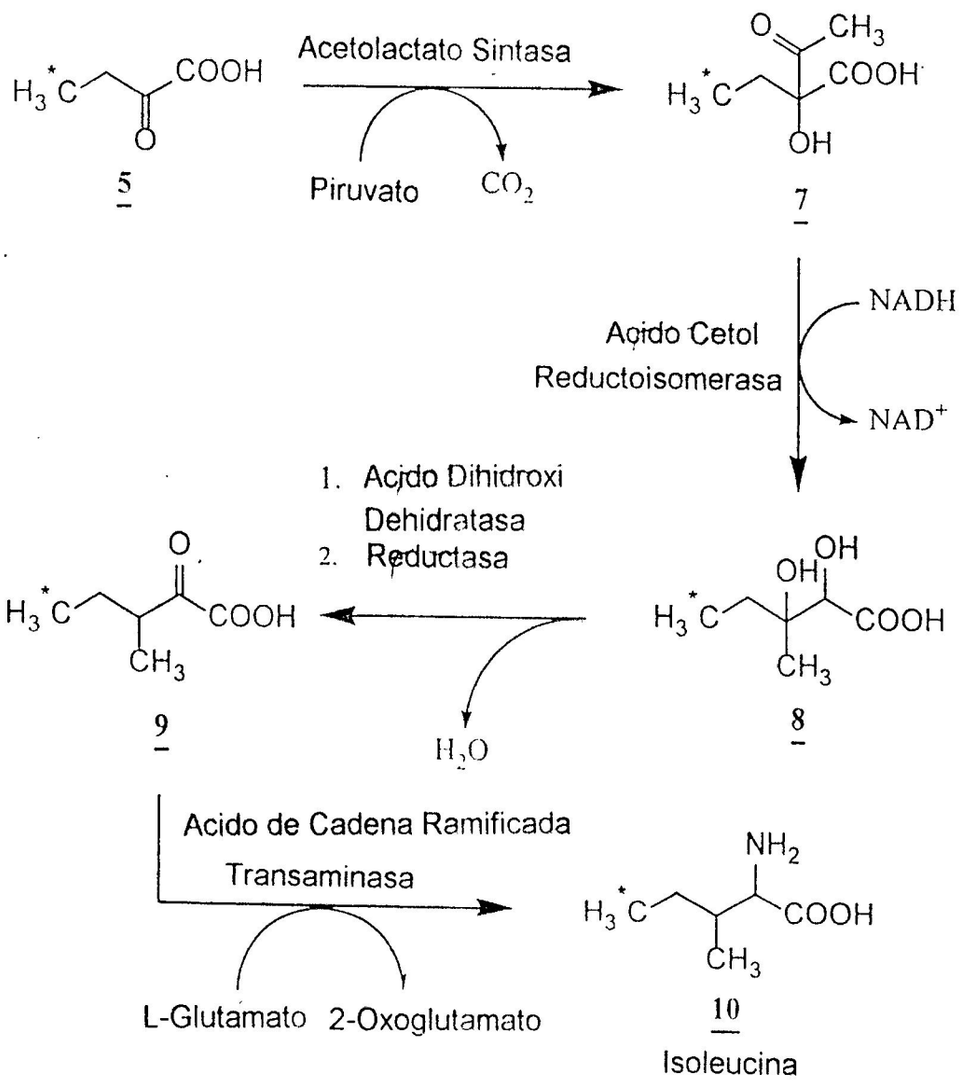


1 2 3 4 5 6

En el Esquema I, el *terc*-butil piruvato, **1**, es convertido en la correspondiente N, N-dimetilhidrazona, **2**, mediante la reacción con N,N-dimetilhidrazina en el éter dietilo a temperatura ambiente. La hidrazona resultante, **2**, se enfría en una solución de tetrahidrofurano a -78° C y se trata con bromuro de litio, seguido con diisopropilamida de litio para formar el intermedio aza-alil enolato. El enolato es alquilatado con yoduro de metilo marcado ^{11}C para producir la hidrazona **3**. Un segundo curso de alquilación de **3** produce la hidrazona dimetilatada marcada, **4**. El tratamiento de **3** y **4** primero con HCl 1N acuoso en tetrahidrofurano o éter dietilo (para remover la hidrazona) seguido por el tratamiento con gas de cloruro de hidrógeno en cloruro de metileno (para remover el éster t-butil) genera los correspondientes α-cetoácidos terminalmente marcados ^{11}C, **5** y **6**. Los Esquemas II, III y IV ilustran, respectivamente, como estos α-cetoácidos son biosintéticamente convertidos en ^{11}C-leucina, isoleucina y valina. En todos los Esquemas, el sitio(s) de enriquecimiento isotópico se indican con asteriscos.

Esquema II

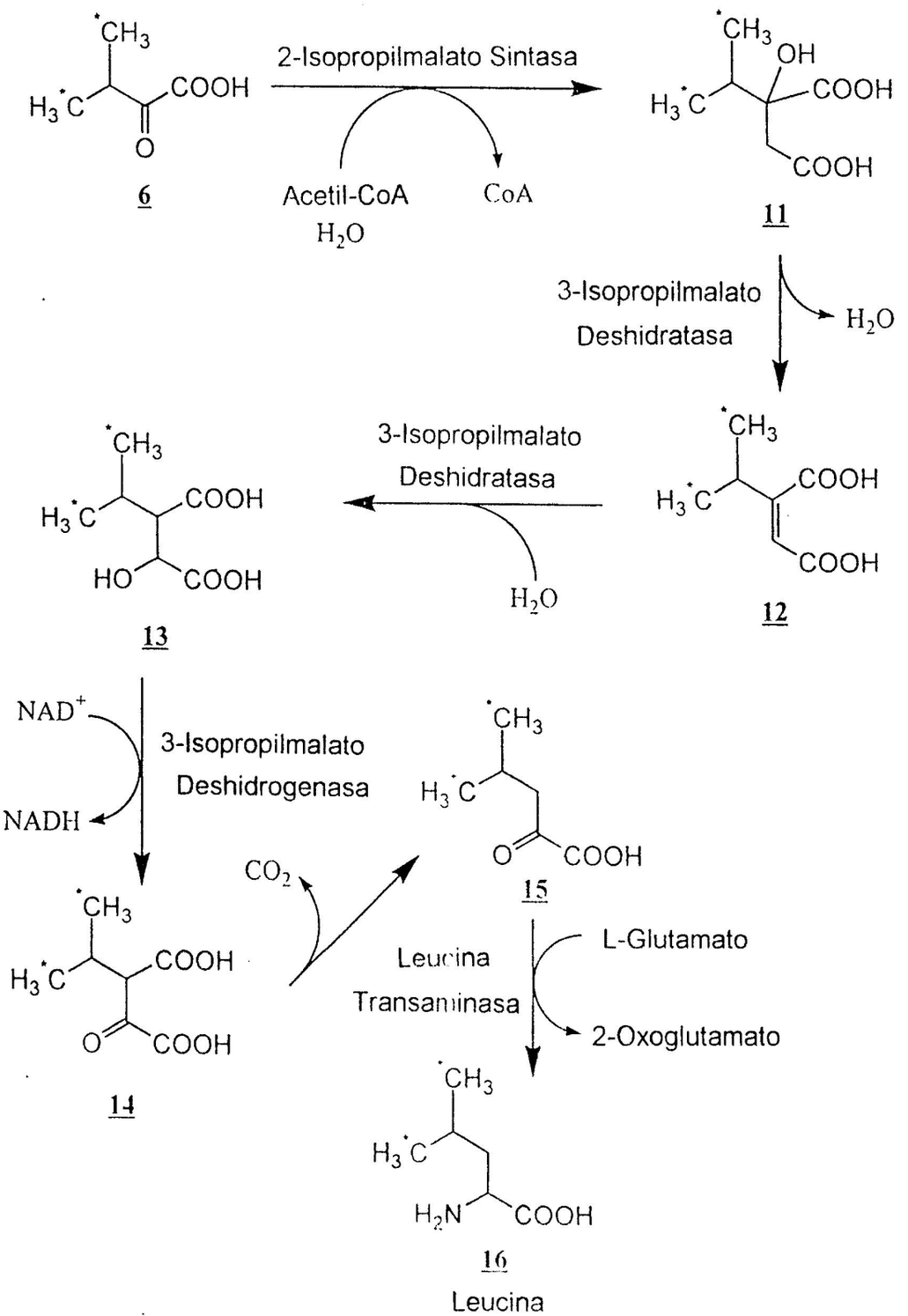
Síntesis Bioquímica de Isoleucina Marcada



<u>5</u> <u>7</u> <u>8</u> <u>9</u> <u>10</u>

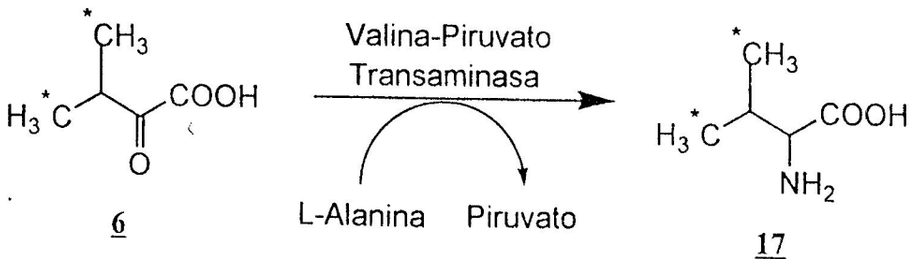
Esquema III

Síntesis Bioquímica de Leucina Marcada



Esquema IV

Síntesis Bioquímica de Valina



6

17

L-Valina

Los medios para la preparación de vectores de expresión que contienen secuencias de polinucleótido que codifican polipéptidos específicos y para la transformación de las células anfitrionas con aquellos vectores son bien conocidos en el arte. (*Ver*, por ejemplo, R. W. Old, *et al., Techniques of Gene Manipulation,* Blackwell Science, Londres, 1994, y tratados similares en el campo). De igual manera, los métodos para el cultivo de las células transformadas para expresar el polipéptido codificado y para aislar, purificar y replicar el polipéptido también son bien conocidos en el arte. Los ejemplos presentados abajo describen la producción de muestras enriquecidas con ^{13}C de la región catalítica de amino ácidos 81-256 de la estromelisina humana (SCD) de *E. coli.* modificada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de Dominio Catalítico Uniformemente Enriquecido con ^{13}C de Estromelisina Humana (SCD)

El fragmento 81-256 (sec. ID No:1) de estromelisina (SCD) se prepara insertando un plásmido que codifica la producción del fragmento de proteína en una cepa de *E. coli* y cultivando la cepa bacteriana genéticamente modificada en un medio de cultivo adecuado. El fragmento de proteína es aislado del medio de cultivo, purificado y subsecuentemente usado en el análisis de RMN bidimensional de su afinidad con compuestos de prueba de acuerdo con el método de esta invención. Los procedimientos para los procesos de preparación se describen abajo.

Fibroblastos de piel humana (ATCC No. CRL 1507) se cultivaron e indujeron usando el procedimiento descrito por Clark, *et al., Archiv. Biochem. and Biophys.*, 241: 36 (1985). El total de RNA es aislado de 1g de células usando, un kit de Sistema de Aislamiento Total de RNA RNAgents® (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una porción de 1 µg del RNA es desnaturalizado mediante calentamiento a 80° C por cinco minutos y luego sometido a PCR por transcriptasa reversa usando el kit RNA PCR GenAmp® (Applied Biosystems/Perkin-Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El PCR anidado se realiza usando primero plantillas (a) GAAATGAAGAGTCTTCAA (SEC ID No. 2) y b) GCGTCCCAGGTTCTGGAG (SEC ID No. 3) y treinta y cinco ciclos a

94° C, dos minutos; 45° C, dos minutos; y 72° C, tres minutos. Esto es seguido por reamplificación con plantillas internas (c) TACCATGGCCTATCCATTGGATGGAGC (SEC ID No. 4) y d) ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGA GTCAGG (SEC ID No. 5) usando treinta y cinco ciclos bajo las mismas condiciones descritas inmediatamente arriba para generar la secuencia de codificación de ADN para los residuos de amino ácidos 1-256 de estromelisina humana.

El fragmento PCR es entonces clonado en un vector de clonación PCR pT7BIue® (Novagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante es cortado con NcoI y BamHI y el fragmento de estromelisina es sub clonado en el vector de expresión pET3d (Novagen, Inc.), de nuevo, usando las instrucciones del fabricante.

Una construcción de expresión de estromelisina madura que codifique para los residuos de amino ácidos 81-256 más un residuo de aminoacilo de metionina iniciadora se genera a partir de la construcción de expresión 1-256 por la amplificación de PCR. El fragmento PCR resultante es primero clonado en el vector pT7BIue® (Novagen, Inc.) y luego sub clonado en el vector pET3d (Novagen, Inc.), usando las instrucciones del fabricante de la manera descrita arriba, para producir el plásmido pETST-83-256. Este plásmido final es idéntico a aquel descrito en Qi-Zhuang, *et al., Biochemestry,* 31: 11231 (1992) con la excepción que el presente plásmido codifica una secuencia peptida que comienza dos amino ácidos mas temprano, específicamente en la posición 81, en la secuencia de estromelisina humana. El plásmido pETST-83-256 es transformado en la cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS (Novagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para generar una cepa de expresión, BL21 (DE3)/pLysS/pETST-255-1.

Un medio de pre cultivo se preparó disolviendo 1,698 g de $NaH_2PO_4 \bullet 7H_2O$, 0.45 g de KH_2PO_4, 0.075 g de NaCl, 0.150 g de NH_4Cl, 0.3 g de U-^{13}C-glucosa, 300 µl de una solución de $MgSO_4$ 1M acuoso, y 15 ml de una solución de $CaCl_2$ acuoso en 150 ml de agua desionizada. La solución resultante del medio de pre cultivo se esterilizó y se transfirió a un balón de regulación de 500 ml esterilizado. Inmediatamente antes de la inoculación del medio de pre cultivo con la cepa bacteriana, 150 ml de una solución que contenía 34 mg/ml de cloramfenicol en etanol al 100% y 1.5 ml de una solución que contiene 20 mg/ml de ampicilina se añadieron al contenido del balón. El contenido del balón se inoculó con 1 ml de reservas de glicerol de cepa *E. coli* genéticamente modificada BL21 (DE3)/pLysS/pETST-255-1. El contenido del balón se agitó (225 rpm) a 37° C hasta que se observóuna densidad óptica de 0.65.

Un medio nutriente de fermentación se preparó mediante la disolución de 113.28 g de $Na_2HPO_4 \bullet 7H_2O$, 30 g de KH_2PO_4, 5 g NaCl y 10 ml de agente antiespumante DF-60 al 1% en 9604 ml de agua desionizada. Esta solución se colocó en un Fermentador New Brunswick Scientific Micros (Edison, NJ) y se esterilizó a 121° C por 40 minutos. Inmediatamente antes de la inoculación del medio de fermentación, los siguientes componentes pre esterilizados fueron añadidos al contenido del contenedor de fermentación: 100 ml de una solución acuosa de NH_4Cl al 10%, 15 g de glucosa uniformemente enriquecida con ^{13}C, 20 ml de una solución acuosa de Mg SO_4 1M, 1 ml de una solución acuosa de $CaCl_2$ 1M, 5 ml de una solución acuosa de clorhidrato de tiamina (10mg/ml), 10 ml de una solución que contiene 34 mg/ml de cloramfenicol en etanol al 100%, y 1.9 g de ampicilina disuelta en la solución de cloramfenicol. El pH de la solución resultante se ajustó a pH 7.00 mediante la adición de una solución acuosa de H_2SO_4 4N.

El pre cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pETST-255-1 del procedimiento de escala del balón de agitación descrito arriba se añadió al contenido del fermentador, y se permitó el crecimiento de las células hasta que se logró una densidad óptica de 0.48. Durante este proceso, el contenido del fermentador fue automáticamente mantenido en pH 7.0 mediante la adición de H_2SO_4 4N o KOH 4N según se necesitó. El contenido de oxigeno disuelto del contenido del fermentador se mantuvo por encima de 55% de saturación de aire mediante un ciclo de cascada el cual incrementó la velocidad de agitado cuando el contenido de oxigeno disuelto cayó por debajo del 55%. El aire fue alimentado al contenido del fermentador a 7 litros estándar por minuto (SLPM) y la temperatura del cultivo se mantuvo a 37° C a lo largo del proceso.

Las células fueron cosechadas por centrifugado a 17,000 x g por 10 minutos a 4° C y los gránulos de células resultantes fueron recogidos y almacenados a -85° C. El producido celular húmedo es 3.5g/l. EL análisis de las fracciones solubles e insolubles de los lisados celulares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE) reveló que aproximadamente el 50% de la estromelisina se encuentró en la fase soluble.

El fragmento de estromelisina preparado como se describe arriba fue purificado empleando una modificación de la técnica descrita por YE, *et al., Biochemestry,* 31:11231 (1992). Las células cosechadas se suspendieron en tampón Tris-HCl 20 mM (ph 8.0), solución de azida de sodio que contiene $MgCl_2$ 1 mM, $ZnCl_2$ 0.5 mM, 25 unidades/ml de encima Benzonase® (Benzxon Pharma A/S Roskilde, Dinamarca) y una mezcla inhibitoria hecha de 4-(2-aminoetil)bencesulfonil floruro ("AEBSF") Leupeptin®, Aprotinin®, y Pepstatin®. (todas a concentraciones de 1 mg/ml. AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin®, y Pepstatin®.están disponibles de American International Chemical). La

mezcla resultante fue suavemente agitada por una hora y luego enfriada hasta 4° C. Las células fueron interrumpidas sonicamente usando un ciclo de trabajo de 50%. El lisado resultante fue centrifugado a 14,000 rpm por 30 minutos y los gránulos de la fracción insoluble se congelaron a -80° C para procesamiento subsecuente.

Se añadió sulfato de amonio sólido al sobrenadante hasta el punto de 20% de saturación y la solución resultante se cargó en una columna de flujo rápido de fenil sefarosa de 700 ml ("Q-Sepharose FF") (Pharmacia Biotech.). Antes de la carga, la columna de sefarosa fue equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.6 a 4° C), CaCl25 mM, y $(NH_4)_2SO_4$ 1M. La columna cargada fue eluida con un gradiente lineal de concentraciones decrecientes de $(NH_4)_2SO_4$ (de 1M hasta 0M) e incrementando las concentraciones de $CaCl_2$ acuoso (de 5mM a 20 mM) en un tampón Tris-HCl en un pH 7.6. Las fracciones activas del eluato fueron recogidas y concentradas en una célula agitada Amicon (Amicon Inc.).

La muestra concentrada fue dializada toda la noche en el tanpón de inicio usado con la columna Q-Sepharosa FF, Tris-HCl 50 mM (pH 8.2 a 4° C) con $CaCl_2$10 mM.

La muestra dializada fue entonces cargada en la columna Q-Sepharosa FF y eluida con un gradiente lineal que comprende el tampón inicial y NaCl 200 nM. La fracción soluble purificada del fragmento de estromelisina fue concentrada y almacenada a 4° C. El gránulo fue solubilizado en guanidina-HCl 8M. La solución se centrifugó por 20 minutos a 20,000 rpm y el sobrenadante se añadió por goteo a un tanpón envolvente que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), $CaCl_2$ 10 mM, $ZnCl_2$ 0.5 mM y el coctel inhibidor de AEBSF, Leupeptin® Aprotinin® y Pepstatina® (todas a concentraciones de 1 µg/ml). El volumen del tampón envolvente fue diez veces mas que el del

sobrenadante. La mezcla del sobrenadante y el tampón envolvente fueron centrifugados a 20,000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se almacenó a 4° C y el gránulo se sometió dos veces a los pasos descritos arriba de solubilización en guanidina -HCl, redoblando el tampón y el centrifugado. Los sobrenadantes finales de cada una de las tres centrifugaciones se combinaron y se añadió sulfato de amonio sólido hasta el punto de 20% de saturación. La solución resultante así derivada de la fracción insoluble fue sujeta a purificación en fenil Sefarosa y Q-Sepharose como se describe arriba para la fracción soluble. Las fracciones purificadas solubles e insolubles se combinaron para producir cerca de 1.8 mg de fragmento 81-256 (SCD) de estromelisina purificada por gramo de la pasta de células original, uniformemente enriquecida con ^{13}C.

Ejemplo 2

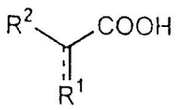
Preparación de Dominio Catalítico Específicamente Enriquecido con ^{13}C de Estromelisina Humana

El SCD se expresó mediante el cultivo de la cepa modificada de *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pETST-255-1 en un medio que contenía ácido 2-ceto-4(^{13}C)- butírico, o una sal resultante, y ácido 2-ceto-3-(^{13}C-metil)-4-(^{13}C)- burítico o una sal resultante. Los métodos usados para la preparación de la cepa modificada por ingeniería genética de *E. coli,* y para la expresión, aislamiento y purificación del fragmento de proteína como se describe arriba, excepto por el uso de U-^{12}C-glucosa , en lugar de U-^{13}C-glucosa.

Será aparente para alguien de habilidades ordinarias en el arte que varias modificaciones en las realizaciones ilustradas pueden ser hechas sin salirse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1.Un compuesto de la fórmula I:

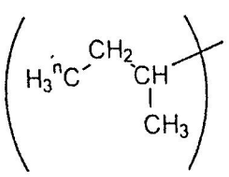


I

o la sal resultante, donde:

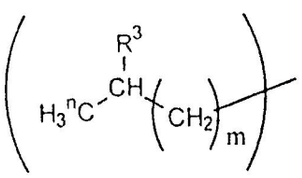
R^1 es oxigeno o NH_2;

R^2 es seleccionada entre un grupo consistente en:



A

y



B

donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$;

el enlace de línea punteada representa un segundo enlace de valencia;

m es cero o uno;

y n, en cada ocurrencia es 13 ó 14;

con las condiciones de que:

i) cuando R^1 es NH_2, el segundo enlace de valencia representado por el enlace de línea

punteada a R^1 está ausente y el hidrógeno unido al enlace de línea punteada está presente;

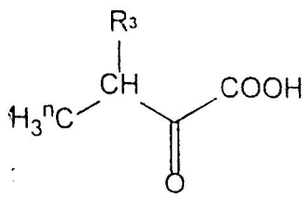
ii) cuando R^1 es oxigeno, el segundo enlace de valencia, representado por el enlace de línea punteada a R^1 está presente y el átomo de hidrógeno unido al enlace de línea punteada está ausente.

iii) cuando R^3 es oxigeno, R^2 es B y m es cero; y

iv) cuando R^1 es NH_2, R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$.

2. Una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contiene un residuo aminoacil derivado de un compuesto de acuerdo a la reivindicación 1 donde R^1 es $-NH_2$.

3. Un compuesto de la fórmula Ia



Ia

o la sal resultante, donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$ y n, en cada ocurrencia es 13 ó 14.

4. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 3 seleccionado entre un grupo consistente en:

ácido 2-ceto-4-(^{13}C)- butírico;

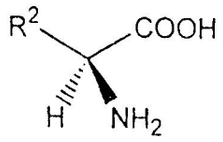
ácido 2-ceto-3-(^{13}C-metil)-4-(^{13}C)- butírico;

ácido 2-ceto-4-(^{14}C)- butírico;

ácido 2-ceto-3-(^{14}C-metil)-4-(^{14}C)- butírico;

o las sales resultantes.

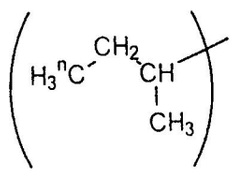
5. Un compuesto de la fórmula Ib donde



Ib

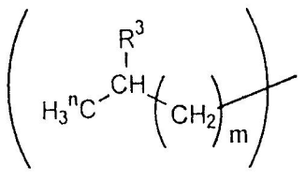
donde

R^2 es seleccionado entre un grupo consistente en:



A

y



B

donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$; m es cero o uno; y n, en cada ocurrencia, es 13 o 14.

6. Un compuesto de acuerdo a la Reivindicación 5 seleccionado entre un grupo consistente en:

ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)- pentanóico;

ácido L-2-amino-3-metil-5-(^{14}C)- pentanóico;

ácido L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)- butanóico;

ácido L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)- butanóico;

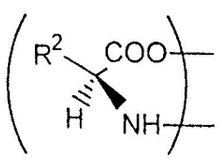
ácido L-2-amino-4-(^{13}C-metil-5-^{13}C)- pentanóico

y

ácido L-2-amino-4-(^{14}C-metil-5-^{14}C)- pentanóico;

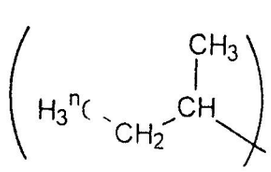
o las sales resultantes

7. Una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contiene uno o más residuos aminoacil, donde dichos uno o más residuos aminoacil comprende un compuesto de fórmula IIb



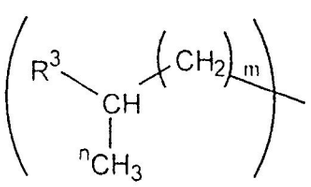
IIb

donde R^2 es seleccionado entre un grupo consistente



A

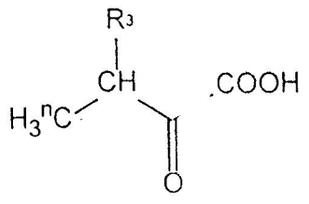
y



B

donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$; m es cero o uno; y n, en cada ocurrencia, es 13 ó 14.

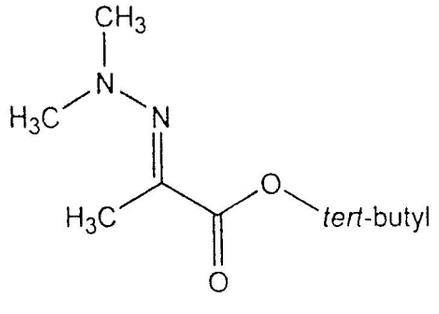
8. Un método para la preparación de un compuesto de fórmula Ia:



Ia

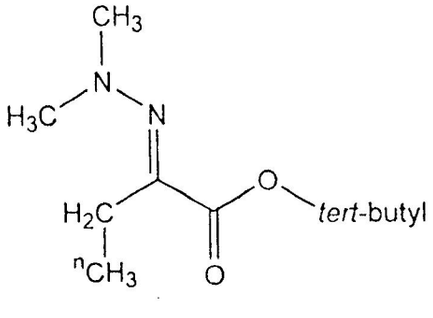
o la sal resultante, donde R^3 es seleccionado entre un grupo consistente en hidrógeno y $^nCH_3$, y n en cada ocurrencia es 13 ó 14. que comprende:

a) reaccionar el compuesto de fórmula IV



IV

con yoduro de metilo isotópicamente marcado ($H_3{}^nCI$) para producir un compuesto de fórmula V.



V

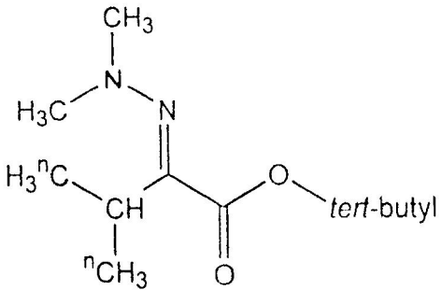
y

b) remover los grupos éster *terc*-butilo y dimetilhidrazino para producir ácido 2-ceto-4-(^{n}C) butírico.

9. Un método de acuerdo a la reivindicación 8, que además comprende la conversión en sal del producto de reacción del paso b).

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende

c) reaccionar el producto del paso b) con yoduro de metilo isotópicamente marcado ($H_3{}^{n}CI$), donde n es 13 o 14, para producir un compuesto de fórmula VI.



VI

y

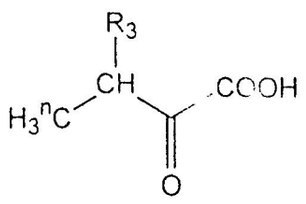
d) remover los grupos éster *terc*-butilo y dimetilhidrazino para producir ácido 2-ceto-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C) - butírico.

11. Un método de acuerdo a la Reivindicación 10, que además comprende la conversión en sal del producto de reacción del paso d).

12. Un método para la preparación de una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contienen al menos un residuo amino acil seleccionado entre el grupo consistente en 4-(^{n}C-metil)-5-(^{n}C)- leucil, 5-(^{n}C)-isoleucil, y 3- (^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-valil, el cual comprenden:

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contiene un compuesto de fórmula Ia



Ia

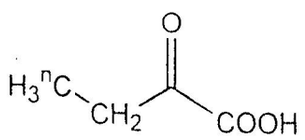
ó la sal resultante, donde n en cualquier ocurrencia, es 13 o 14, y R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$; y

c) aislar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido.

13. Un método para la preparación de un proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contienen al menos un residuo aminoacil 3-metil-5-(^{n}C)-isoleucil,
que comprende:

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contiene un compuesto de fórmula Ia"



Ia"

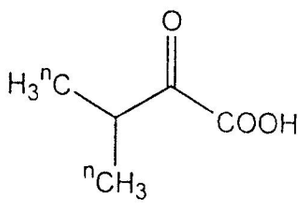
ó la sal resultante, donde n en cualquier ocurrencia, es 13 o 14,y

c) aislar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido.

14. Un método para la preparación de ácido-2-amino-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-butírico que comprende:

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar un homopolímero de valina;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contiene un compuesto de fórmula Ia'



Ia'

ó la sal resultante, donde n, en cualquier ocurrencia, es 13 o 14;

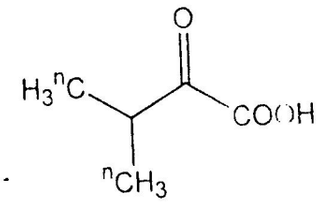
c) aislar el homopolímero de valina expresado por dicho microorganismo genéticamente modificado; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir ácido 2-amino-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)- butírico.

15. Un método para la preparación de ácido 2-amino-4-(^{n}C-metil)-5-(^{n}C)- pentanóico que comprende:

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar un homopolímero de leucina;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contiene un compuesto de fórmula Ia'



Ia'

ó la sal resultante, donde n, en cualquier ocurrencia, es 13 o 14;

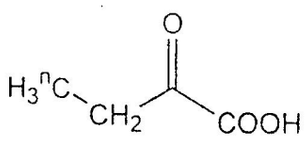
c) aislar el homopolímero de leucina expresado por dicho microorganismo genéticamente modificado; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir ácido 2-amino-4-(^{n}C-metil)-5-(^{n}C)- pentanóico.

16. Un método para la preparación de ácido 2-amino-3-metil-5-(^{n}C)-pentanóico que comprende:

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar un homopolímero de isoleucina;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contiene un compuesto de fórmula Ia"



Ia"

ó la sal resultante, donde n, en cualquier ocurrencia, es 13 o 14;

c) aislar el homopolímero de isoleucina expresado por dicho microorganismo genéticamente modificado; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir ácido 2-amino-3-metil-5-(^{n}C)- pentanóico.

Listado de Secuencias

<110> Augeri, David J.
Fesik, Stephen F.

<120> Proteínas, Amino Acidos y Precursores Bioquímicos, Resultantes de Sitio Específico Isotópicamente Mercados
<130> 6470.US.01
<160> 5
<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
<210> 1
<211>174
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región catalítica 81-256 de estromelisina humana

<400> 1

Fen	Arg	Tre	Fen	Pro	Gli	Ile	Pro	Lis	Trp	Arg	Lis	Tre	His	Leu	Tre
1				5					10					15	
Tir	Arg	Ile	Val	Asn	Tir	Tre	Pro	Asp	Leu	Pro	Lis	Asp	Ala	Val	Asp
			20					25					30		
Ser	Ala	Val	Glu	Lis	Ala	Leu	Lis	Val	Trp	Glu	Glu	Val	Tre	Pro	Leu
		35					40					45			
Tre	Fen	Ser	Arg	Leu	Tir	Glu	Gli	Glu	Ala	Asp	Ile	Met	Ile	Ser	Fen
	50					55					60				
Ala	Val	Arg	Glu	His	Gli	Asp	Fer	Tir	Pro	Fen	Asp	Gli	Pro	Gli	Asn
65					70					75					80
Val	Leu	Ala	His	Ala	Tir	Ala	Pro	Gli	Pro	Gli	Ile	Asn	Gli	Asp	Ala
				85					90					95	
His	Fen	Asp	Asp	Asp	Glu	Gln	Trp	Tre	Lis	Asp	Tre	Tre	Gli	Tre	Asn
			100					105					110		

Leu	Fen	Leu	Val	Ala	Ala	His	Glu	Ile	Gli	His	Ser	Leu	Gli	Leu	Fen
		115					120					125			
His	Ser	Ala	Asn	Tre	Glu	Ala	Leu	Met	Tir	Pro	Leu	Tir	His	Ser	Leu
	130					135					140				
Tre	Asp	Leu	Tre	Arg	Fen	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Asp	Ile	Asn	Gli	Ile
145					150					155					160
Gln	Ser	Leu	Tir	Gli	Pro	Pro	Pro	Asp	Ser	Pro	Glu	Tre	Pro		
				165					170						

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Plantilla

<400> 2

gaaatgaaga gtcttcaa

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Plantilla

<400> 3

gcgtcccagg ttctggag

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Plantilla

<400> 4

taccatggcc tatccattgg atggagc

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Plantilla

<400> 5

ataggatcct taggtctcag gggagtcagg

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: 06-04-2000

(71) SOLICITANTE: ABBOTT LABORATORIES

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 09/289.517

(72) INVENTOR/ES: Stephen W. Fesik y David J. Augeri.

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-04-99

(33) PAÍS: US

(74) APODERADO: JOSE ANTONIO LLOREDA

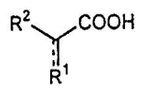
(54) TÍTULO:

"PROTEINAS Y AMINO ACIDOS DE SITIO ESPECIFICO, MARCADOS ISOTÓPICAMENTE Y PRECURSORES BIOQUIMICOS RESULTANTES"

(57) RESUMEN:

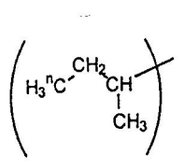
Reivindicación número 1.-

Un compuesto de la fórmula I:



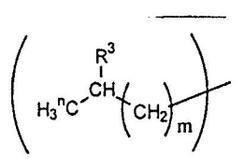
I

o la sal resultante, donde:
R^1 es oxigeno o NH_2;
R^2 es seleccionada entre un grupo consistente en:



A

y



B

donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$;
el enlace de línea punteada representa un segundo enlace de valencia;
m es cero o uno;
y n, en cada ocurrencia es 13 ó 14;
con las condiciones de que:

i) cuando R^1 es NH_2, el segundo enlace de valencia representado por el enlace de línea punteada a R^1 está ausente y el hidrógeno unido al enlace de línea punteada está presente;
ii) cuando R^1 es oxigeno, el segundo enlace de valencia, representado por el enlace de línea punteada a R^1 está presente y el átomo de hidrógeno unido al enlace de línea punteada está ausente.
iii) cuando R^3 es oxigeno, R^2 es B y m es cero; y
iv) cuando R^1 es NH_2, R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$.

47

REPUBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.

CERTIFICACION

Se hace constar que el Señor(a) MARIA MERCEDES URICOECHEA TORRES se encuentra debidamente registrado(a) ante el Ministerio de Relaciones Exteriores, como traductor e interprete oficial para los idiomas Ingles - Español - Ingles, según resolución N° 10607 de fecha 31 de Diciembre de 1981 del Ministerio de Justicia.

Se expide a los 6 dias del mes de Abril de 1983.

Atentamente,

RAFAEL HUMBERTO PEÑA FLOREZ
JEFE DE NEGOCIOS GENERALES

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 24 AGO. 1998

COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA 29 JUL. 1999
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA 24 NOV. 1998

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
REPUBLICA DE COLOMBIA

Abbott Laboratories
6470

ST
48

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS A QUIENES LLEGUE EL PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Marcas y Patentes

14 de marzo de 2000.

LA PRESENTE CERTIFICA QUE LA ADJUNTA ES UNA COPIA TOMADA DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE ABAJO IDENTIFICADA Y LA CUAL CUMPLE CON LOS REQUISITOS PARA QUE LE SEA CONFERIDA UNA FECHA DE RADICACIÓN SEGÚN 35 USC 111.

NÚMERO DE SOLICITUD *09/289,517*

FECHA DE RADICACIÓN: *09 de abril de 1999*

Por Autoridad del

COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES

(FIRMA W. MONTGOMERY

Oficial de Certificaciones

(SELLO DORADO DE OBLEA)

* * * *

María Mercedes Urcoeches
Res. No. 10607
Traductora Juramentada

SC.
49

REMISION DE SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD

Expediente No. 7470.US.O1
Nombre del primer Inventor nombrado; DAVID J. AUGERI
Rotulo Correo Expreso: EL835515564US

SOLICITUD DE PATENTES
Comisionado Asistente e Patentes
Washington D.C. 20231

Elementos de la Solicitud

(Solo se marca lo pertinente)

1. [x] Formato de Comisión
2. [x] Especificación total 42 página
3. [x] Dibujos Hojas 1
4. a. [x] Original nuevo
5. N/A
6. N/A

Partes que la acompañan

7. [x] Documentos de cesión
8. N/A
9. N/A
10. N/A
11. [x]
12. Acuse recibo (MPEP 53)
13. N/A
14. N/A
15. Otro Ver 2 Anexo
16. N/A

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

Nombre Steven F. Weinstock
Abbott Laboratories
100 Abbott Park Road
Dirección D-377 AP6D
Ciudad Abbott Park Estado IL CODIGO ZIP – 60064-6050

Firma Jandle D. Strobe

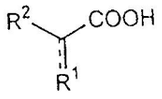
Registro No. 34.738
Fecha- 9 de abril de 1999

María Mercedes Ugoeches
Res. No. 10607 Ministerio
Traductora Juramentada

PROTEINAS ROTULADAS ISOTÓPICAMENTE ESPECIFICAS DE SITIO, AMINO ACIDOS Y PRECURSORES QUIMICOS PARA LO MISMO

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)

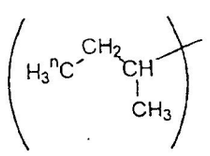


I

o una sal del mismo, en donde

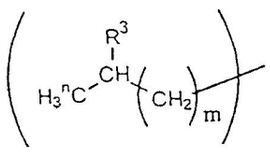
R^1 es oxígeno o NH_2;

R2 es seleccionado del grupo compuesto por



A

and



B

en donde R^1 es hidrógeno o $^nCH_3$, el enlace con línea punteada representa un enlace de segunda valencia;

m es cero o uno;

y **n**, en cada ocurrencia, es 13 ó 14;

con la condición de que

i) cuando R^1 sea NH_2, el enlace de la segunda valencia representado por el enlace con línea punteada a R1 esté ausente y el hidrógeno fijo al enlace con línea punteada esté ausente;

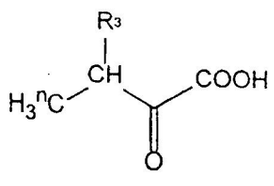
ii) cuando R^1 sea oxígeno, el enlace de la segunda valencia representado por el enlace de la línea punteada a R^1 esté presente y el átomo de hidrógeno fijo al enlace con la línea punteada esté ausente;

iii) cuando R^1 sea oxígeno, R^2 sea B y **m** sea cero; y

iv) cuando R^1 sea NH_2, R^3 sea hidrógeno o $^nCH3$.

2. Una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contiene un residuo de aminoacil derivado de un compuesto según la Reivindicación 1, en donde R1 es -NH2.

3. Un compuesto de la fórmula Ia



Ia

María Mercedes Innocenti
Reg. No. 10607
Traductora Juramentada

o sal de lo mismo, en donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$ y n, en cada ocurrencia es 13 o 14.

4. Un compuesto según la Reivindicación 3 seleccionado del grupo compuesto por

2-ceto-4-(^{13}C)-ácido butírico;

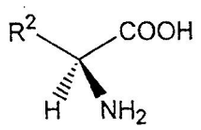
2-ceto-3-(^{13}C-metil)-4-(^{13}C)-ácido butírico

2-ceto-4-(^{14}C)-ácido butírico; y

2-ceto-3-(^{13}C-metil)-4-(^{14}C)-ácido butírico;

o sales de lo mismo.

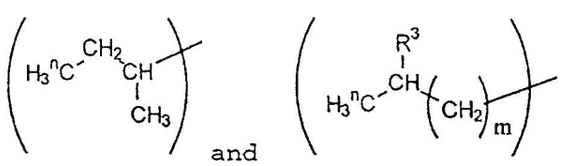
5. Un compuesto de la fórmula Ib



Ib

en donde

R^2 es seleccionado del grupo compuesto por



A B

María Mercedes
Res. No. 10307
Traductora Jurament

donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$; m es cero o uno; y n, en cada ocurrencia, es 13 o 14.

6. Un compuesto según la Reivindicación 5, seleccionado del grupo compuesto por

L-2-amino-3-metil-5-(^{13}C)-ácido pentanóico;

L-2-amino-3-metil-5-(^{14}C)-ácido pentanóico;

L-2-amino-3-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)-ácido butanóico;

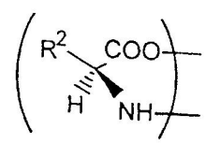
L-2-amino-3-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)-ácido butanóico;

L-2-amino-4-(^{13}C-metil)-5-(^{13}C)-ácido pentanóico;

Y

L-2-amino-4-(^{14}C-metil)-5-(^{14}C)-ácido pentanóico; o sales de lo mismo.

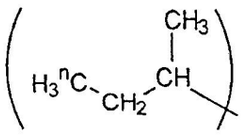
7. Una proteína, fragmento o polipéptido que contiene uno o más residuos de aminoacil, en donde dicho uno o más residuos de amino acil comprende un compuesto de la fórmula IIb

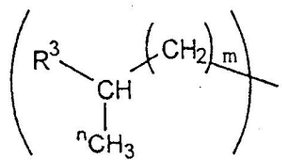


IIb

María Mercedes [illegible]
[illegible]
Traductora Juramentada

en donde R^2 es seleccionado del grupo compuesto por



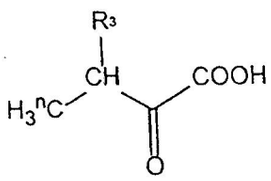


and

A **B**

en donde R^3 es hidrógeno o $^nCH_3$; **m** es cero o uno; y **n**, en cada ocurrencia, es 13 o 14.

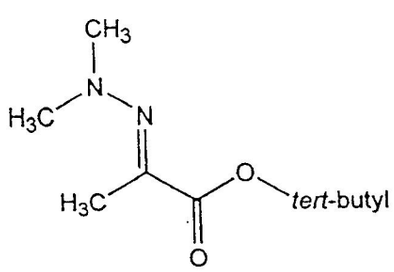
8. un método para preparar un compuesto de la fórmula Ia



Ia

o una sal de lo mismo, en donde R^3 es seleccionado del grupo consistente de hidrógeno y $^nCH_3$, y **n** en cada ocurrencia es 13 o 14, que comprende

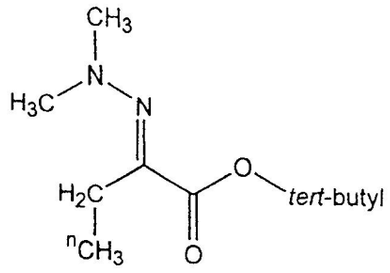
a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula IV



IV

María Mercedes Urbaneja
Reg. No. 1092
Traductora Juramentada

con yoduro de metilo rotulado isotópicamente ($H_3{}^nCI$) para producir un compuesto de la fórmula V



V

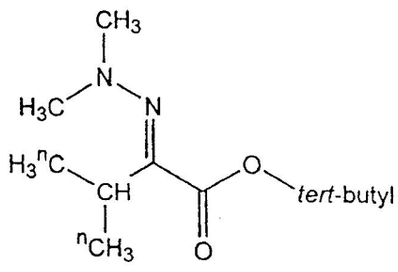
y

b) remover los grupos de tert-butil ester y dimetilhidrazino para producir 2-ceto-4-(^nC)-ácido butírico.

9. Un método según la Reivindicación 8, que además comprende salificar el producto de reacción del paso b).

10. Un método según la Reivindicación 8, que además comprende

a) hacer reaccionar el producto del paso b) con yoduro de metil rotulado isotópicamente, donde **n** es 13 o 14, para producir un compuesto de la fórmula VI



VI

María Mercedes
Traductora

y

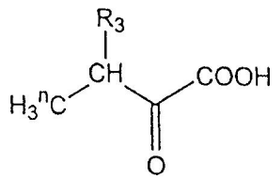
b) remover los grupos de tert-ester butil y dimetilhidrazino para producir 2-ceto-3-(^{n}C)-metil)-4-(nC)-ácido butírico.

11. Un método según la Reivindicación 10, que además consiste en salificar el producto de reacción del paso b)

12. Un método para preparar una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contiene al menos un residuo acil amino seleccionado del grupo compuesto por 4-(^{n}C-metil)-5-(^{n}C)-leucil, 5-(^{n}C)-isoleucil, y 3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-valil, que consiste en

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido;

b) cultivar dicho microorganismo genéticamente modificado en un medio nutriente que contenga un compuesto de la fórmula Ia



Ia

María Mercedes Urioste
Mes. No. 10927
Traductora Juramentada

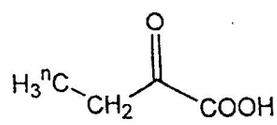
o una sal de lo mismo, en donde **n**, en cada ocurrencia es 13 o 14, y R^3 es hidrógeno o b CH_3; y

c) aislar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido.

13. Un método para preparar una proteína, fragmento de proteína o polipéptido que contiene al menos un residuo 3-metil-5-(^{n}C)-isoleucil, aminoacil, que consiste en

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido;

b) cultivar dicho microorganismo genéticamente modificado en un medio nutriente que contenga un compuesto de la fórmula Ia"



o una sal de lo mismo, en donde **n**, en cada ocurrencia es 13 o 14.

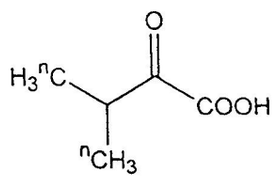
c) asilar dicha proteína, fragmento de proteína o polipéptido.

14. Un método para preparar 2-amino-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-ácido butírico que consiste en

María Mercedes [illegible]
Ics. No. [illegible]
Traductora Jurament[illegible]

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar un homopolímero de valina;

b) cultivar dicho microorganismo genéticamente modificado en un medio nutriente que contenga un compuesto de la fórmula Ia'



Ia'

o una sal de lo mismo, donde **n**, en cada ocurrencia, es 13 o 14;

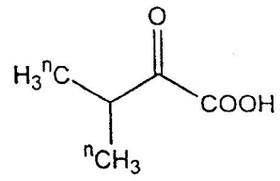
c) aislar el homopolímero de valida expresado por dicho microorganismo modificado genéticamente; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir 2-amino-3-(^{n}C-metil)-4-(^{n}C)-ácido butírico.

15. Un método para preparar 2-amino-4-(^{n}C-metil)-5-(^{n}C)-ácido pentanóico que consiste en

a) modificar genéticamente un microorganismo para expresar un homopolímero de leucina;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contenga un compuesto de la fórmula Ia'



Ia'

o una sal de lo mismo, donde **n** , en cada ocurrencia, es 13 o 14;

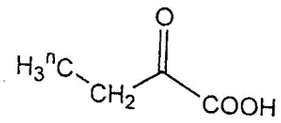
c) aislar el homopolímero de leucina expresado por dicho microorganismo modificado genéticamente; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir 2-amino-4-(nC-metil)-4-(nC)-ácido pentanóico.

16. Un método para preparar 2-amino-3-metil-5-(nC)-ácido pentanóico que consiste en

a) modificar genéticamente un microorganismo adecuado para expresar un homopolímero de isoleucina;

b) cultivar dicho microorganismo modificado genéticamente en un medio nutriente que contenga un compuesto de la fórmula Ia"



Ia"

María Mercedes Uranochea
Reg. No. 10667 Autorizada
Traductora Juramentada

o una sal de lo mismo, donde **n** en cada ocurrencia, es 13 o 14;

c) aislar el homopolímero de isoleucina expresado por dicho microorganismo modificado genéticamene; y

d) fragmentar dicho homopolímero para producir 2-amino-3-metil-5-(^{n}C)-ácido pentanóico.

María Mercedes [illegible]
Res. No. 10607 [illegible]
Traductora [illegible]

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS EE.UU.

Solicitantes; D.J. Augieri y otros

Serie Aun no ha sido asignada

Título Proteinas Rotuladas isotópicamente específicas de sitio, amino ácidos y precursores bioquímicos para las mismas.

Caso No. **6570 US.01**

DECLARACION Y PODER PARA SOLICITUD DE PATENTE

Como el inventor abajo nombrado declaro que creo que soy el inventor original, primero y conjunto del objeto materia que se reivindica y para el cual se busca una patente sobre la invención titulada Proteinas Rotuladas isotópicamente específicas de sitio, amino ácidos y precursores bioquímicos para las mismas, cuya especificación adjunto.

Los detalles del lugar de mi residencia, mi dirección postal y la ciudadanía son los que aparecen al frente de mi nombre.

Declaro que he revisado y entiendo el contenido de la especificación arriba identificada, incluidas las reivindicaciones, junto con sus modificaciones.

Acepto el deber de revelar información que sea material al examen de la solicitud de conformidad con el Título 37 del Código de la Reglamentación Sección 1.56(a)

Reclamo beneficios de prioridad extranjera bajo el Título 35, Código EE.UU., Artículo 119 del certificado de inventor.

NINGUNO

Las siguientes solicitudes para certificado de patente o de inventor tienen una fecha de radicación anterior a la fecha de radicación de las siguientes solicitudes.

María Mercedes [illegible]
[illegible] No. [illegible]
Traductora [illegible]

NINGUNA

Reclamo beneficio bajo 35 U.S.C. S. 120 de las siguientes solicitudes de partente estadounidense radicadas previamente.

NINGUNO

Reclamo beneficio de prioridad bajo el Título 35, Código EE.UU., Artículo 119(e) de cualquier solicitud estadounidense

NINGUNO

Por la presente nombro a los siguientes Apoderados y/o patentes para que prosigan con esta solicitud y con cualquier solicitud o solicitudes de división basadas en la misma, y para llevar a cabo todos los actos relacionados con ella ante la Oficina de Marcas y Patentes de los EE.UU.

(NOTA. Sigue lista de Apoderados con sus Registros)

Solicito dirigir toda la correspondencia a:

Steven FG. Weinstock
Abbott Laboratories
D-377/AP6D
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500

Dirigir todas las llamadas telefónicas a:

Janelle S. Strode (847) 937-4395

Nombre completo de los Inventores:

STEVEN W. FESIK

Residencia	1099 Portsmouth Circle Gurnee, IL 60031
Ciudadanía	Estadounidense
Dirección Postal	1099 Portsmouth Circle Gurnee, IL 60031

María Mercedes [illegible]
Reg. No. 10607
Traductora Juramentada

66
63

DAVID J. AUGERI

Residencia	6846 Third Avenue Kenosha, WI 53143
Ciudadanía	Estadounidense
Dirección Postal	6846 Third Avenue Kenosha, WI 53143

Declaro que todas las afirmaciones que hago aquí están basadas en mi conocimiento son correctas y además que las hago a sabiendas que las declaraciones falsas y similares son punibles con multa o prisión o ambas, conforme a la Sección 1001 del Título 18 del Código de los EE.UU., y que tales declaraciones falsas pueden poner en peligro la validez de la solicitud o de cualquier patente que se expida con base en ella.

FIRMA – STEPHEN W. FESIK 3/18/99
FIRMA – DAVID J. AUGERI 3/18/99

María Mercedes Uroneche
Res. No. 10607 Matrícula
Traductora Juramentada

63
64

PA 218517

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

March 14, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: *09/289,517*
FILING DATE: *April 09, 1999*

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

G. Montgomery

W. MONTGOMERY
Certifying Officer

65

Please type a plus sign (+) inside this box → [+]

PTO/SB/05 (4/98)
Approved for use through 09/30/2000. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL

(Only for new nonprovisional applications under 37 C.F.R. § 1.53(b))

Attorney Docket No.	6470.US.01
First Inventor or Application Identifier	David J. Augeri
Title	See 1 in Addendum
Express Mail Label No.	EE835515564US

APPLICATION ELEMENTS

See MPEP chapter 600 concerning utility patent application contents.

ADDRESS TO: Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, DC 20231

1. [X] * Fee Transmittal Form *(e.g., PTO/SB/17)*
(Submit an original and a duplicate for fee processing)

2. [X] Specification [Total Pages 42]
(preferred arrangement set forth below)
- Descriptive title of the Invention
- Cross References to Related Applications
- Statement Regarding Fed sponsored R & D
- Reference to Microfiche Appendix
- Background of the Invention
- Brief Summary of the Invention
- Brief Description of the Drawings *(if filed)*
- Detailed Description
- Claim(s)
- Abstract of the Disclosure

3. [ ] Drawing(s) *(35 U.S.C. 113)* [Total Sheets [ ]]

4. Oath or Declaration [Total Pages [ ]]
a. [X] Newly executed (original or copy)
b. [ ] Copy from a prior application (37 C.F.R. § 1.63(d))
(for continuation/divisional with Box 16 completed)
i. [ ] DELETION OF INVENTOR(S)
Signed statement attached deleting inventor(s) named in the prior application, see 37 C.F.R. §§ 1.63(d)(2) and 1.33(b).

NOTE FOR ITEMS 1 & 13 IN ORDER TO BE ENTITLED TO PAY SMALL ENTITY FEES, A SMALL ENTITY STATEMENT IS REQUIRED (37 C.F.R. § 1.27), EXCEPT IF ONE FILED IN A PRIOR APPLICATION IS RELIED UPON (37 C.F.R. § 1.28).

5. [ ] Microfiche Computer Program *(Appendix)*

6. Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Submission
(if applicable, all necessary)
a. [ ] Computer Readable Copy
b. [ ] Paper Copy (identical to computer copy)
c. [ ] Statement verifying identity of above copies

ACCOMPANYING APPLICATION PARTS

7. [X] Assignment Papers (cover sheet & document(s))
8. [ ] 37 C.F.R.§3.73(b) Statement *(when there is an assignee)* [ ] Power of Attorney
9. [ ] English Translation Document *(if applicable)*
10. [ ] Information Disclosure Statement (IDS)/PTO-1449 [ ] Copies of IDS Citations
11. [ ] Preliminary Amendment
12. [X] Return Receipt Postcard (MPEP 503)
(Should be specifically itemized)
13. [ ] * Small Entity Statement(s) *(PTO/SB/09-12)* [ ] Statement filed in prior application Status still proper and desired
14. [ ] Certified Copy of Priority Document(s)
(if foreign priority is claimed)
15. [X] Other: See 2 in Addendum

16. If a CONTINUING APPLICATION, *check appropriate box, and supply the requisite information below and in a preliminary amendment:*
[ ] Continuation [ ] Divisional [ ] Continuation-in-part (CIP) of prior application No: _____/_____
Prior application information: Examiner _____ *Group / Art Unit:* _____
For CONTINUATION or DIVISIONAL APPS only: The entire disclosure of the prior application, from which an oath or declaration is supplied under Box 4b, is considered a part of the disclosure of the accompanying continuation or divisional application and is hereby incorporated by reference. The incorporation can only be relied upon when a portion has been inadvertently omitted from the submitted application parts.

17. CORRESPONDENCE ADDRESS

[ ] *Customer Number or Bar Code Label* *(Insert Customer No. or Attach bar code label here)* or [X] *Correspondence address below*

Name	Steven F. Weinstock Abbott Laboratories				
Address	100 Abbott Park Road D-377 AP6D				
City	Abbott Park	State	IL	Zip Code	60064-6050
Country		Telephone	(847) 937-4395	Fax	(847) 938-2623

Name (Print/Type)	Janelle D. Strode	Registration No. (Attorney/Agent)	34,738
Signature	Janelle D. Strode	Date	April 9, 1999

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Box Patent Application, Washington, DC 20231.

66

Site-Specific Isotopically-Labeled Proteins, Amino Acids, and Biochemical Precursors Therefor

Field of the Invention

The present invention relates to site-specific isotopically-labeled organic compounds and processes for their preparation. More particularly, the present invention concerns site-specific isotopically-labeled biochemical precursors of leucine, isoleucine, and valine, the isotopically-labeled amino acids *per se*, proteins, protein fragments or polypeptides made therefrom, and related methods of preparation.

Background of the Invention

A recently-developed technique for discovering new drug leads involves the use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to discover compounds that bind to a particular target molecule such as a protein (*see*, for example, United States Patent Nos. 5,698,401 and 5,804,390, to Fesik, *et al.*). The technique involves the determination of a first two-dimensional $^{15}N/^{1}H$ NMR correlation spectrum of a protein in which nitrogen atom sites have been isotopically enriched with ^{15}N. This first correlation spectrum is obtained for the protein in the absence of any potential ligand compound(s). Next a

suspected ligand compound, or a mixture of such putative ligand compounds, is mixed with the isotopically enriched protein, and a second NMR correlation spectrum is obtained. The two spectra are compared, and differences between the two spectra provide information about 1) the existence of binding between any ligand and the host protein, 2) the site(s) of binding, and 3) the strength(s) of binding.

The technique described in Fesik, *et al.*, *supra*, employs target molecules which have been isotopically enriched with the NMR-detectable ^{15}N spin nucleus. This method relies upon the genetic modification of a suitable microorganism to express the desired protein, protein fragment, or polypeptide, followed by culturing the modified microorganism in a nutrient medium containing assimilable sources of carbon and nitrogen which include ^{15}N-labeled nutrients. Comparatively inexpensive commercially available ^{15}N ammonium salts provided the ^{15}N source.

However, the application of this NMR drug discovery technique to target molecules isotopically enriched with ^{13}C has been hampered by two drawbacks. First, it is comparatively expensive to produce ^{13}C-enriched target molecules in any useful quantities. For example, the production of proteins by genetically modified microorganisms grown in nutrient media containing commercially available uniformly-labeled glucose (glucose-$^{13}C_6$) is expensive. At the time of filing this application, the cost of glucose-$^{13}C_6$ was approximately

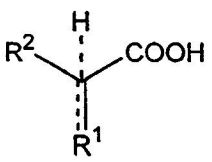
$480/g. Alternatively, the production of ^{13}C-labeled proteins by including uniformly ^{13}C-labeled amino acids in the nutrient medium is similarly expensive. Second, the biomolecules produced using glucose-$^{13}C_6$ or commercially available uniformly ^{13}C-enriched amino acids are not ideally suited for the NMR correlation spectra technique. Biomolecules expressed by microorganisms grown in nutrient media containing uniformly ^{13}C-enriched starting materials contain adjacent ^{13}C-labeled carbon atoms. Since the NMR technique depends upon detection of spatial spin coupling (i.e., the nuclear Overhauser effect), the relatively strong spin-spin coupling of adjacent ^{13}C nuclei interferes with the desired observation. There is thus a need for the development of site-specifically ^{13}C-enriched amino acids, proteins and polypeptides.

Summary of the Invention

The instant invention provides biochemical precursors of the site-specific isotopically-enriched amino acids leucine, isoleucine, and valine, as well as the site-specific isotopically-enriched amino acids *per se*. Additionally, proteins, protein fragments and polypeptides containing site-specific isotopically-enriched aminoacyl residues derived from these amino acids, and methods for their production, are also provided. The amino acids and the amino acid biosynthetic precursors are isotopically enriched with

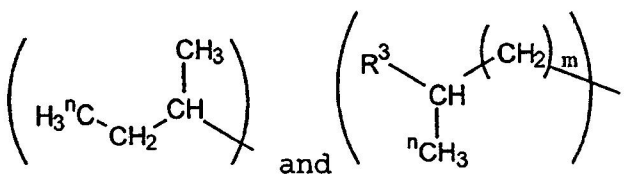
either ^{13}C or ^{14}C at the carbon atoms of methyl groups most remote from their carboxyl group. In the labeled amino acids of the present invention, non-adjacent carbon atoms are labeled. In the case where the label is ^{13}C, the amino acids of this invention are thus ideally suited for use in the NMR drug discovery technique, since there is no interference with the desired signals by adjacent atom ^{13}C-^{13}C spin-spin interaction. Moreover, since the amino acids are labeled only at methyl groups, the three magnetically equivalent hydrogen atoms of the methyl group(s) provide strong NMR signals for observation of any effects of coupling with the ^{13}C atom(s) to which they are attached.

Specifically, the present invention provides compounds of formula I



I

or a salt thereof, wherein R^1 is oxygen or NH_2, and R^2 is selected from the group consisting of



A and B

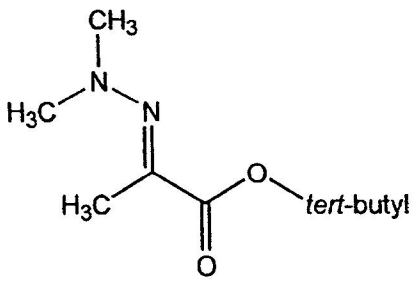
In the formulae presented above, R^3 is hydrogen or $^nCH_3$, the dotted line bonds represent valence bonds, m is zero or one, and n, at each occurrence, is 13 or 14, with the provisos that: a) when R^1 is NH_2, the second valence bond represented by the dotted line bond to R^1 is absent and the hydrogen attached to the dotted line bond is present; b) when R^1 is oxygen, the second valence bond represented by the dotted line bond to R^1 is present and the hydrogen atom attached to the dotted line bond is absent; c) when R^1 is oxygen, R^2 is B and m is zero; and d) when R^1 is NH_2, R^3 is hydrogen or $^nCH_3$.

The present invention provides the site-specific ^{13}C- and ^{14}C-enriched amino acids isoleucine (formula I above where R^1 is amino, R^2 is A); leucine (formula I above where R^1 is amino, R^2 is B, R^3 is $^nCH_3$, and m is one), and valine (formula I above where R^1 is amino, R^2 is B, R^3 is $^nCH_3$, and m is zero), and the site-specific ^{13}C- and ^{14}C-enriched biochemical precursors of these amino acids, 2-keto-4-(^nC)-butyric acid (formula I above where R^1 is oxygen, R^2 is B, m is zero, and R^3 is hydrogen) and 2-keto-3-(^nC-methyl)-4-(^nC)-butyric acid (formula I above where R^1 is oxygen, R^2 is B, m is zero, and R^3 is $^nCH_3$). In the foregoing, n represents either 13 (i.e., ^{13}C-enriched compounds) or 14 (i.e., ^{14}C-enriched compounds).

The present invention further provides proteins, protein fragments, and polypeptides containing aminoacyl residues derived from one or more of the amino acids selected from the group consisting of L-2-amino-3-methyl-

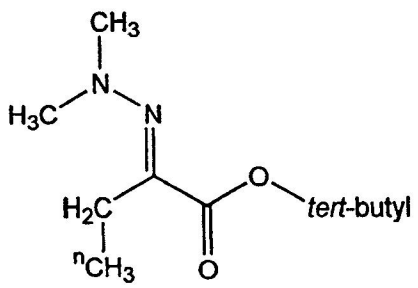
5-(^{13}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid; L-2-amino-4-(^{13}C-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic; L-2-amino-4-(^{14}C-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-butanoic acid; and L-2-amino-3-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-butanoic acid.

Also provided by the present invention are chemical methods of preparing the site-specific ^{13}C- and ^{14}C-labeled biochemical precursors acids, 2-keto-4-(^{n}C)-butyric acid and 3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid, or salts thereof, which involves reacting a compound of formula IV



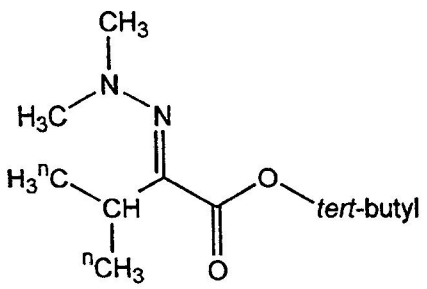
IV

with isotopically-labeled methyl iodide ($H_3{}^{n}CI$) to produce a compound of formula V



V;

removing the protecting *tert*-butyl ester and dimethylhydrazino groups of a compound of formula V to produce 2-keto-4-(^{n}C)-butyric acid; or further reacting a compound of formula V with isotopically-labeled methyl iodide ($H_3{}^{n}CI$) where n is 13 or 14, to produce a compound of formula VI



VI;

removing the protecting *tert*-butyl ester and dimethylhydrazino groups to produce 2-keto-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid; and optionally salifying the products.

The present invention additionally provides methods for preparing the site-specific ^{13}C- and ^{14}C-labeled amino acids, leucine, isoleucine, and valine. The process involves genetically modifying a microorganism to express a polypeptide containing an amino acid selected from leucine, isoleucine, valine and mixtures thereof; culturing the modified microorganism in a nutrient medium containing assimilable sources of carbon and nitrogen which includes 2-keto-4-(^{n}C)-butyric acid, 2-keto-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid, and salts and mixtures

thereof; isolating the resulting expressed polypeptide; and fragmenting the polypeptide and isolating the individual amino acids. The expressed polypeptide is fragmented by conventional methods known in the art including hydrolysis or enzymatic cleavage.

The yield of a particular amino acid may be maximized and the cost minimized by modifying the host microorganism to express a homopolymer of the amino acid, and utilizing the appropriate isotopically enriched biosynthetic precursor in the nutrient medium.

The present invention still further provides a method of preparing a protein, protein fragment, or polypeptide containing amino acyl residues derived from amino acids selected from the group consisting of L-2-amino-3-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid ; L-2-amino-4-(^{13}C-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic; L-2-amino-4-(^{14}C-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-butanoic acid; and L-2-amino-3-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-butanoic acid which involves genetically modifying a microorganism to express a predetermined protein, protein fragment or polypeptide; culturing the modified microorganism in a nutrient medium containing assimilable sources of carbon and nitrogen which includes 2-keto-4-(^{n}C)-butyric acid, 2-keto-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid, and salts and mixtures thereof; and isolating the resulting expressed polypeptide.

Detailed Description of the Invention

The natural isotopic abundance of ^{13}C is 1.11%, and that of ^{14}C is negligibly low. Thus the probability that any given carbon atom within an organic molecule is ^{13}C is normally about 0.0111, and the probability that any given carbon atom is ^{14}C is quite low. When target proteins are prepared for use in the adapted NMR "screening" or drug discovery process as described by Fesik, *et al.*, *supra*, it is desirable that the ^{13}C NMR signal be enhanced by increasing the natural ^{13}C content of the target molecule being studied. This is accomplished by either uniformly or selectively enriching the target molecule with ^{13}C. As used throughout this specification and the appended claims, the terms "uniform enrichment," "uniformly enriching," "uniformly enriched," uniform labeling" and "uniformly labeled" mean increasing to a value greater than 0.0111, by synthetic means, the probability that a carbon atom randomly selected throughout the target molecule will be ^{13}C. The terms "specific enrichment," "site-specific enrichment," "specifically enriching," "specifically enriched," "specifically labeling" and "specifically labeled" mean increasing to a value greater than 0.0111, by synthetic means, the probability that carbon atoms at one or more specific pre-selected site(s) within the target molecule will be ^{13}C.

For example, biomolecules expressed by genetically modified microorganisms grown in a nutrient medium containing uniformly ^{13}C-enriched glucose will be

uniformly ^{13}C enriched. A protein expressed by a genetically modified microorganism grown in a nutrient medium containing an amino acid which is ^{13}C-enriched only on the methyl side chain would be specifically enriched by ^{13}C at the alanyl residues contained within the expressed protein. Similarly, proteins expressed by the method of this invention will be site-specifically enriched by ^{13}C or ^{14}C at the side-chain terminal methyl groups of leucine, isoleucine, and valine.

The method of the present invention also permits the preparation of site-specifically labeled leucine, isoleucine and valine, proteins, protein fragments, or polypeptides made from these labeled amino acids, and the amino acid biosynthetic precursors with labeled with ^{14}C as well as ^{13}C. Such compounds are useful, for example, in studies of protein metabolism where it is desirable to follow the course and fate of protein degradation by radiometric methods.

Further terms used throughout this specification and the appended claims have their usually accepted meanings. The following specific terms have the ascribed meanings:

"DTT" means dithiothreitol.

"HEPES" denotes N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethylsulfonic acid.

"IPTG" means isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside.

"PMSF" refers to α-toluenesulfonyl fluoride.

"SCD" refers to the catalytic domain (residues 81-256) of stromelysin.

The preparation of an exemplary site-specific ^{n}C-enriched protein fragment target molecule is set forth below. The particular example shown demonstrates the preparation of the so-called "catalytic domain" of human stromelysin ("SCD"), labeled with site-specific ^{13}C-enriched leucine, valine, and isoleucine. While shown with ^{13}C-labeled amino acid precursors, the method is equally applicable starting with ^{14}C-labeled amino acid precursors. A preferred means of preparing adequate quantities of specifically ^{n}C-enriched polypeptide-containing target molecules involves the transformation of a host cell with an expression vector containing a polynucleotide encoding the desired polypeptide. The protein or polypeptide protein fragment is expressed by culturing the transformed cell line in a medium containing assimilable sources of carbon and nitrogen well known in the art and including the ^{n}C-enriched biochemical precursors of this invention. For site-specific labeling of the protein or protein fragment in accordance with the present invention, assimilable sources for ^{n}C labeling of a target polypeptide include ^{n}C-labeled biosynthetic precursors of amino acids.

For example, it is known that α-keto-butyrate is the biosynthetic precursor of isoleucine, and that α-keto-isovalerate is the biosynthetic precursor of both valine and leucine. Scheme I below shows how the specifically ^{n}C-enriched biosynthetic precursors of leucine, isoleucine, and valine can be synthesized. The Scheme employs the comparatively inexpensive ^{n}C-enriched methyl

iodide, $H_3{}^nCI$, as the source for isotopic enrichment to produce ^{n}C-terminally-labeled α-keto-butyric acid and α-keto-isovaleric acid.

The use of a uniformly ^{13}C-enriched nutrient such as glucose-$^{13}C_6$ has been typically used as a convenient means of introducing ^{13}C enrichment into a target compound; however, it is very expensive. Furthermore, a vast majority of the carbon sites in uniformly ^{13}C-labeled targets will have a covalently bonded neighbor which is also ^{13}C-labeled, introducing ^{13}C-^{13}C coupling which can negatively impact both the signal-to-noise and the relaxation properties of ^{13}C-labeled sites in the target biomolecule. Alternatively, the nutrient medium may include commercially available uniformly ^{13}C-labeled amino acids. While this technique reduces the "dilution" of the labeling, it too, is a costly alternative and likewise suffers from the drawback of adjacent carbon atom ^{13}C-^{13}C spin-spin interactions.

However, the method of the present invention for ^{n}C-labeling of a polypeptide target molecule comprises growing the genetically modified cell line in a nutrient medium containing ^{n}C-labeled biosynthetic precursors of particular amino acids. Not only are certain of the amino acids in the resulting protein, protein fragment or polypeptide isotopically enriched, those amino acids are site-specifically labeled.

In a method of one embodiment of the invention, preferred amino acid precursors are labeled α-keto-butyric acid and α-keto-isovaleric acid. The

biosynthetic products of these precursors are leucine, isoleucine, and valine, in which particular side-chain methyl groups are ^{n}C-enriched. Because the methyl groups each have three hydrogen atoms connected to a ^{n}C-labeled carbon atom, when n is 13, the corresponding NMR signals are particularly strong and distinctive.

The synthesis for labeled α-keto-butyric acid and α-keto-isovaleric acid involves the C-methylation of the terminal carbon atom in pyruvic acid with ^{n}C-enriched methyl iodide. Normally, the alkylation of α-keto acids such as pyruvate is inherently difficult and is accompanied by decomposition of the enolate intermediate with the formation of numerous side products. However, Spencer, *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 1975, 3889 and Williams, *et al.*, *ibid.*, 1990, 5881 have shown that alkylation of the corresponding oxime enolate has been carried out, although alkylation with primary electrophiles (for example, methyl iodide) was problematic. D. Enders, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Eng. Ed.*, 1992, 618 and D. Enders, *et al.*, *Synlett*, 1992, 901 have demonstrated that alkylation of an N,N-dimethylhydrazone of pyruvate is possible, but specifically mentioned that the bulky 2,6-dialkyl phenyl ester was necessary to prevent self acylation.

Representative compounds of the present invention include the following:

2-keto-4-(^{13}C)-butyric acid or a salt thereof;

2-keto-4-(^{14}C)-butyric acid or a salt thereof;

2-keto-3-(^{13}C-methyl)-4-(^{13}C)-butyric acid or a salt thereof;

2-keto-3-(^{14}C-methyl)-4-(^{14}C)-butyric acid or a salt thereof;

L-2-amino-3-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic acid or a salt thereof;

L-2-amino-3-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid or a salt thereof;

L-2-amino-4-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-pentanoic acid or a salt thereof;

L-2-amino-4-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-pentanoic acid or a salt thereof;

L-2-amino-3-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-butanoic acid or a salt thereof; and

L-2-amino-3-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-butanoic acid or a salt thereof.

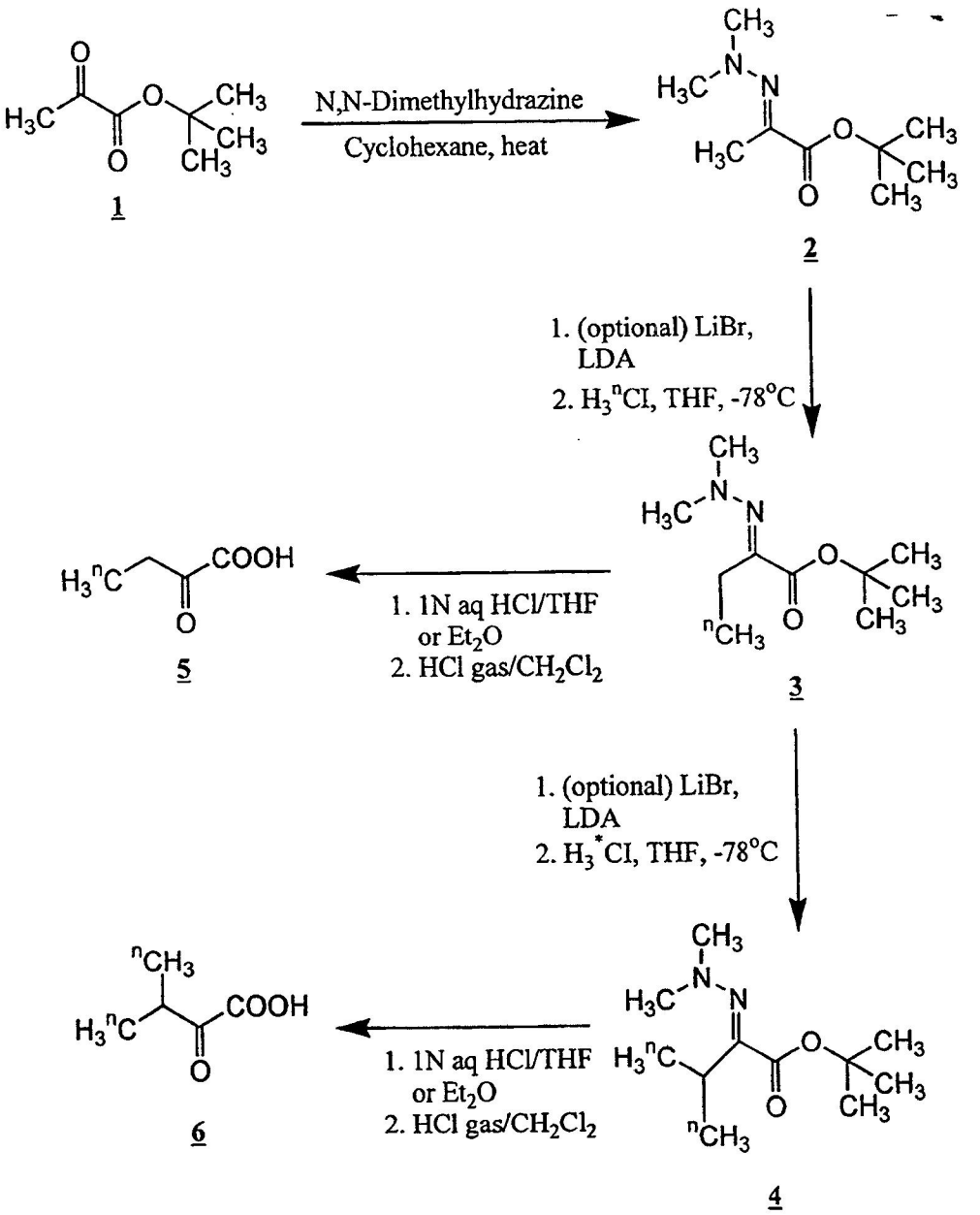
The present invention additionally encompasses proteins, protein fragments, and polypeptides containing the site-specific isotopically enriched amino acids L-2-amino-3-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid; L-2-amino-4-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-pentanoic; L-2-amino-4-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-pentanoic acid; L-2-amino-3-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-butanoic acid; and L-2-amino-3-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-butanoic acid.

Although the specific compounds named above have been designated as having ^{13}C- or ^{14}C-isotopes at specific sites in the compound, it will be understood by those of ordinary skill in the art that the carbon atoms at these sites in the compounds will not be completely ^{13}C or ^{14}C

labeled. The degree of isotopic substitution or "enrichment" at each molecular site depends upon the corresponding degree of enrichment contained in the starting materials utilized in the synthesis.

Scheme I

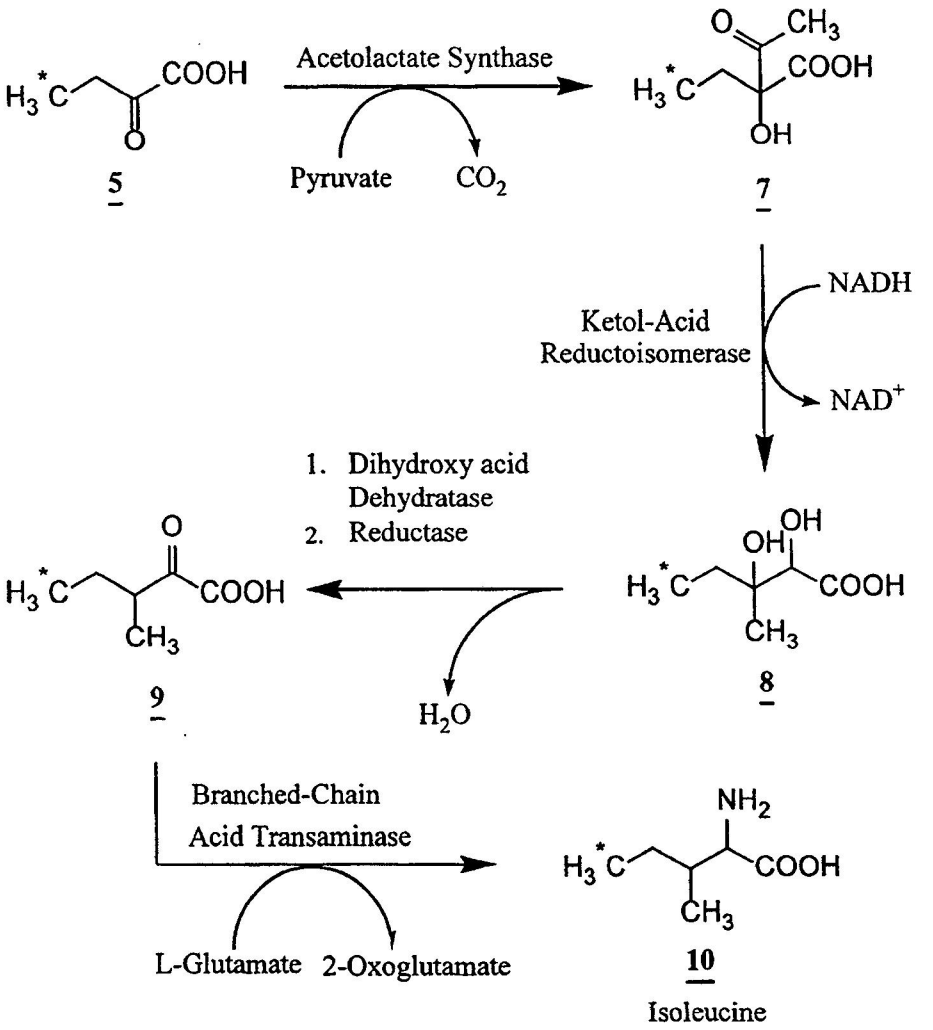
Chemical Synthesis of Labeled Precursors



In Scheme I, *tert*-butyl pyruvate, **1**, is converted to the corresponding N, N-dimethylhydrazone, **2**, by reaction with N,N-dimethylhydrazine in diethyl ether at room temperature. The resulting hydrazone, **2**, is cooled in a tetrahydrofuran solution to -78°C, and treated with lithium bromide, followed by lithium diisopropylamide to form the intermediate aza-allyl enolate. The enolate is alkylated with ^{n}C-labeled methyl iodide to produce hydrazone **3**. A second course of alkylation of **3** produces the labeled dimethylated hydrazone, **4**. Treatment of **3** and **4** first with aqueous 1N HCl in tetrahydrofuran or diethyl ether (to remove hydrazone) followed by treatment with hydrogen chloride gas in methylene chloride (to remove the t-butyl ester) gives the corresponding ^{n}C-terminally labeled α-ketoacids, **5** and **6**. Schemes II, III, and IV illustrate, respectively, how these α-ketoacids are biosynthetically converted into ^{n}C-leucine, isoleucine and valine. In all of the Schemes, the site(s) of isotopic enrichment are indicated by asterisks.

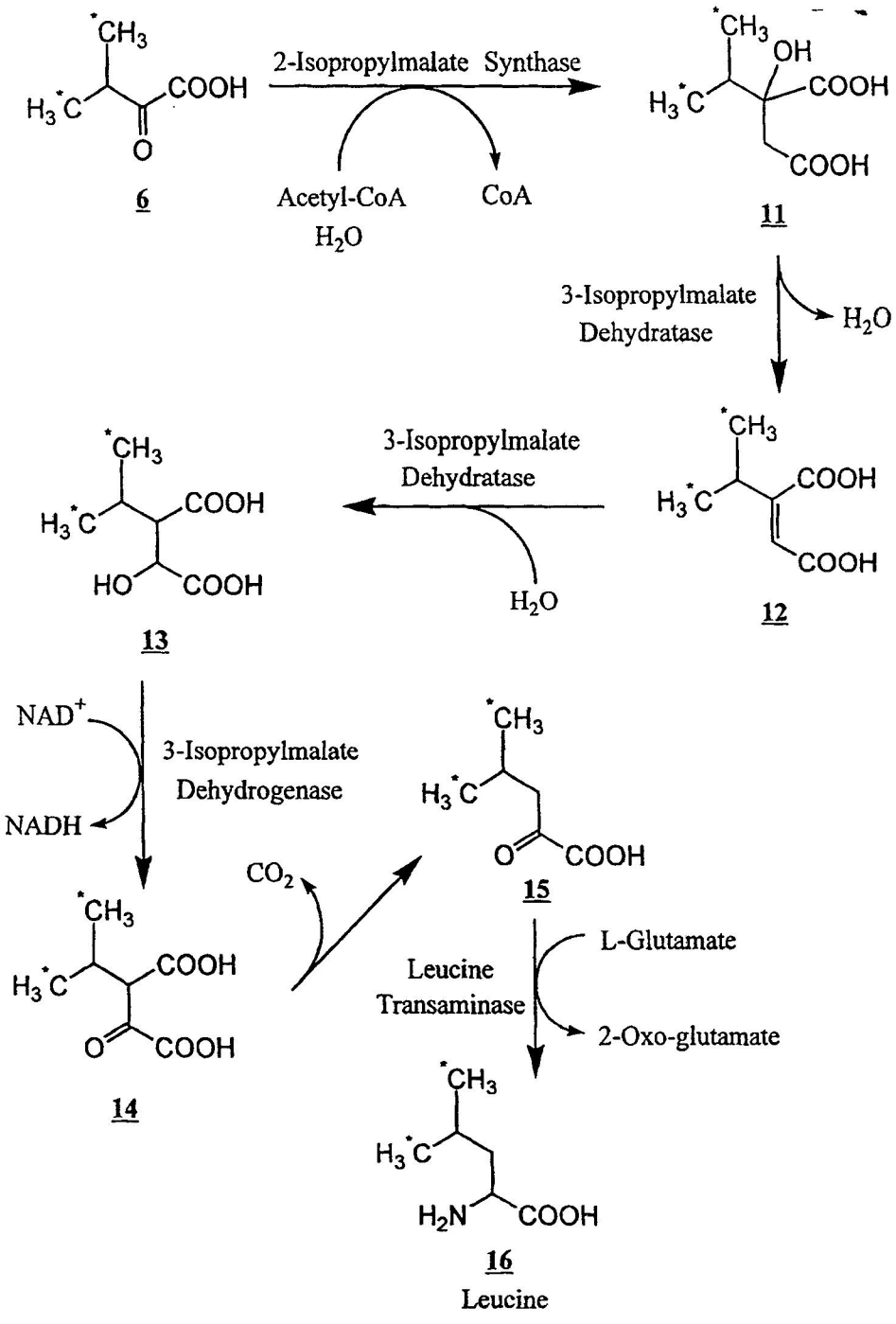
Scheme II

Biochemical Synthesis of Labeled Isoleucine



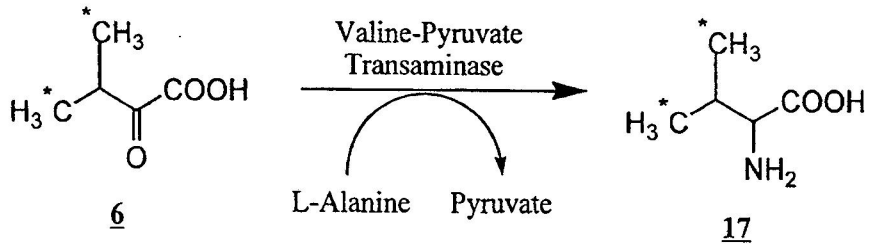
Scheme III

Biochemical Synthesis of Labeled Leucine



Scheme IV

Biochemical Synthesis of Valine



6 17

L-Valine

Means for preparing expression vectors that contain polynucleotide sequences coding specific polypeptides and for transforming host cells with those vectors are well known in the art. (*See*, for example R. W. Old, *et al.*, *Techniques of Gene Manipulation*, Blackwell Science, London, 1994, and similar treatises in the field.) Likewise, methods for culturing the transformed cells to express the coded polypeptide and for isolating, purifying and re-folding the polypeptide are also well known in the art. Examples presented below describe the production of ^{13}C-enriched samples of the 81-256 amino acid catalytic region of human stromelysin (SCD) from modified *E. coli*.

EXAMPLES

Example 1

Preparation of Uniformly ^{13}C-Enriched Catalytic Domain of Human Stromelysin (SCD)

The 81-256 fragment (SEQ ID NO: 1) of stromelysin (SCD) is prepared by inserting a plasmid which codes for the production of the protein fragment into an *E. coli* strain and growing the genetically-modified bacterial strain in a suitable culture medium. The protein fragment is isolated from the culture medium, purified, and subsequently used in the two-dimensional NMR analysis of its affinity with test compounds in accordance with the method of this invention. The procedures for the preparation processes are described below.

Human skin fibroblasts (ATCC No. CRL 1507) are grown and induced using the procedure described by Clark, *et al.*, *Archiv. Biochem. and Biophys.*, 241: 36 (1985). Total RNA is isolated from 1 g of cells using a RNAgents® Total RNA Isolation System Kit (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711, USA) following the manufacturer's instructions. A 1 μg portion of the RNA is denatured by heating at 80°C for five minutes and then subjected to reverse transcriptase PCR using a GenAmp® RNA PCR kit (Applied Biosystems/Perkin-Elmer) following the manufacturer's instructions.

Nested PCR is performed using first primers (a) GAAATGAAGAGTCTTCAA (SEQ ID NO: 2) and (b)

GCGTCCCAGGTTCTGGAG (SEQ ID No. 3) and thirty-five cycles of 94°C, two minutes; 45°C, two minutes; and 72°C, three minutes. This is followed by re-amplification with internal primers (c) TACCATGGCCTATCCATTGGATGGAGC (SEQ ID NO: 4) and (d) ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGA GTCAGG (SEQ ID NO: 5) using thirty cycles under the same conditions described immediately above to generate a DNA sequence coding for amino acid residues 1-256 of human stromelysin.

The PCR fragment is then cloned into PCR cloning vector pT7BIue® (Novagen, Inc.) according to the manufacturer's instructions. The resulting plasmid is cut with NcoI and BamHI and the stromelysin fragment is sub-cloned into the expression vector pET3d (Novagen, Inc.), again using the manufacturer's instructions.

A mature stromelysin expression construct coding for amino acid residues 81-256 plus an initiating methionine aminoacyl residue is generated from the 1-256 expression construct by PCR amplification. The resulting PCR fragment is first cloned into the pT7BIue® vector (Novagen, Inc.) and then sub-cloned into the pET3d vector (Novagen, Inc.), using the manufacturer's instructions in the manner described above, to produce plasmid pETST-83-256. This final plasmid is identical to that described by Qi-Zhuang, *et al.*, *Biochemistry*, 31: 11231 (1992) with the exception that the present plasmid codes for a peptide sequence beginning two amino acids earlier, specifically at position 81, in the sequence of human stromelysin. Plasmid pETST-83-256 is transformed into *E.*

coli strain BL21(DE3)/pLysS (Novagen, Inc.) in accordance with the manufacturer's instructions, to generate an expression strain, BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1.

A pre-culture medium is prepared by dissolving 1.698 g of $NaH_2PO_4 \bullet 7H_2O$, 0.45 g of KH_2PO_4, 0.075 g NaCl, 0.150 g NH_4Cl, 0.3 g U-^{13}C-glucose, 300 μl of 1M aqueous $MgSO_4$ solution, and 15 ml of aqueous $CaCl_2$ solution in 150 ml of deionized water. The resulting solution of pre-culture medium is sterilized and transferred to a sterile 500 ml baffle flask. Immediately prior to inoculation of the pre-culture medium with the bacterial strain, 150 ml of a solution containing 34 mg/ml, of chloramphenicol in 100% ethanol and 1.5 ml of a solution containing 20 mg/ml of ampicillin is added to the flask contents. The flask contents are then inoculated with 1 ml of glycerol stock of genetically modified *E. coli* strain BL21(DE3)/pLysS/pETST-255- 1. The flask contents are shaken (225 rpm) at 37°C until an optical density of 0.65 is observed.

A fermentation nutrient medium is prepared by dissolving 113.28 g of $Na_2HPO_4 \bullet 7H_2O$, 30 g of KH_2PO_4, 5 g NaCl and 10 ml of 1% DF-60 antifoam agent in 9604 ml of deionized water. This solution is placed in a New Brunswick Scientific Micros Fermenter (Edison, NJ) and sterilized at 121°C for 40 minutes. Immediately prior to inoculation of the fermentation medium, the following pre-sterilized components are added to the fermentation vessel contents: 100 ml of a 10% aqueous solution of NH_4Cl, 15 g of uniformly ^{13}C-enriched glucose, 20 ml of an

aqueous 1M solution of $MgSO_4$, 1 ml of an aqueous 1M $CaCl_2$ solution, 5 ml of an aqueous solution of thiamin hydrochloride (10 mg/ml), 10 ml of a solution containing 34 mg/ml of chloramphenicol in 100% ethanol, and 1.9 g of ampicillin dissolved in the chloramphenicol solution. The pH of the resulting solution is adjusted to pH 7.00 by the addition of an aqueous solution of 4N H_2SO_4.

The pre-culture of *E. coli* strain BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 from the shake flask scale procedure described above is added to the fermenter contents, and cell growth is allowed to proceed until an optical density of 0.48 is achieved. During this process, the fermenter contents are automatically maintained at pH 7.0 by the addition of 4N H_2SO_4 or 4N KOH as needed. The dissolved oxygen content of the fermenter contents is maintained above 55% air saturation through a cascaded loop which increased agitation speed when the dissolved oxygen content dropped below 55%. Air is fed to the fermenter contents at 7 standard liters per minute (SLPM) and the culture temperature is maintained at 37°C throughout the process.

The cells are harvested by centrifugation at 17,000 x g for 10 minutes at 4°C and the resulting cell pellets are collected and stored at -85°C. The wet cell yield is 3.5 g/L. Analysis of the soluble and insoluble fractions of cell lysates by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) reveals that approximately 50% of the stromelysin was found in the soluble phase.

The stromelysin fragment prepared as described above is purified employing a modification of the technique described by Ye, *et al.*, *Biochemistry*, 31: 11231 (1992). The harvested cells are suspended in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), sodium azide solution containing 1mM $MgCl_2$, 0.5 mM $ZnCl_2$, 25 units/ml of Benzonase® enzyme (Benzon Pharma A/S Roskilde, Denmark), and an inhibitor mixture made up of 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride ("AEBSF") Leupeptin®, Aprotinin® and Pepstatin® (all at concentrations of 1 mg/ml. AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin®, and Pepstatin® are available from American International Chemical). The resulting mixture is gently stirred for one hour and then cooled to 4°C. The cells are then sonically disrupted using a 50% duty cycle. The resulting lysate is centrifuged at 14,000 rpm for 30 minutes and the pellet of insoluble fraction frozen at -80°C for subsequent processing.

Solid ammonium sulfate is added to the supernatant to the point of 20% of saturation and the resulting solution loaded onto a 700 ml phenyl Sepharose fast flow ("Q-Sepharose FF) column (Pharmacia Biotech.). Prior to loading, the Sepharose column is equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6 at 4°C), 5 mM CaC12, and 1M $(NH_4)_2SO_4$. The loaded column is eluted with a linear gradient of decreasing concentrations of aqueous $(NH_4)_2SO_4$ (from 1M down to 0M) and increasing concentrations of aqueous $CaCl_2$ (from 5 mM to 20 mM) in Tris-HCl buffer at pH 7.6. The active fractions of eluate are collected and concentrated in an Amicon stirred cell (Amicon Inc.).

The concentrated sample is dialyzed overnight in the starting buffer used with the Q-Sepharose FF column, 50 mM Tris-HCl (pH 8.2 at 4°C) with 10 mM $CaCl_2$.

The dialyzed sample is then loaded on the Q-Sepharose FF column and eluted with a linear gradient comprising the starting buffer and 200 nM NaCl. The purified soluble fraction of the stromelysin fragment is concentrated and stored at 4°C. The pellet is solubilizcd in 8M guanidine-HCl. The solution is centrifuged for 20 minutes at 20,000 rpm and the supernatant added dropwise to a folding buffer comprising 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $ZnCl_2$ and the inhibitor cocktail of AEBSF, Leupeptin(R) Aprotinin(R) and Pepstatin(R) (all at concentrations of 1 μg/ml). The volume of folding buffer is ten times that of the supernatant. The mixture of supernatant and folding buffer are centrifuged at 20,000 rpm for 30 minutes. The supernatant from this centrifugation is stored at 4°C and the pellet subjected twice to the steps described above of solubilization in guanidine-HCl, refolding in buffer, and centrifugation. The final supernatants from each of the three centrifugations are combined and solid ammonium sulfate was added to the point of 20% saturation. The resulting solution thus derived from the insoluble fraction is subjected to purification on phenyl Sepharose and Q-Sepharose as described above for the soluble fraction. The purified soluble and insoluble fractions are combined to produce about 1.8 mg of purified

stromelysin 81-256 fragment (SCD) per gram of original cell paste, uniformly enriched with ^{13}C.

Example 2

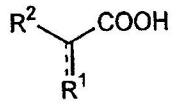
Preparation of Specifically ^{13}C-Enriched Catalytic Domain of Human Stromelysin (SCD)

SCD is expressed by culturing the BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 modified *E. coli* strain in a medium comprising 2-keto-4-(^{13}C)-butyric acid, or a salt thereof, and 2-keto-3-(^{13}C-methyl)-4-(^{13}C)-butyric acid, or a salt thereof. The methods used for preparation of the genetically-engineered strain of *E. coli*, and for expressing, isolating, and purifying the protein fragment are as described above, except for the use of U-^{12}C-glucose, instead of U-^{13}C-glucose.

It will be apparent to one of ordinary skill in the art that various modifications in the illustrated embodiments can be made without departing from the scope of the present invention.

WE CLAIM:

1. A compound of formula I

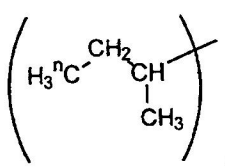


I

or a salt thereof, wherein

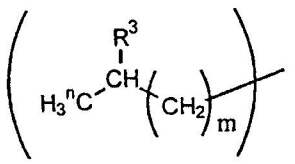
R^1 is oxygen or NH_2;

R^2 is selected from the group consisting of



A

and



B

,

wherein R^3 is hydrogen or $^nCH_3$;

the dotted line bond represents a second valence bond;

m is zero or one;

and n, at each occurrence, is 13 or 14;

with the provisos that

i) when R^1 is NH_2, the second valence bond represented by the dotted line bond to R^1 is absent and the hydrogen attached to the dotted line bond is present;

ii) when R^1 is oxygen, the second valence bond represented by the dotted line

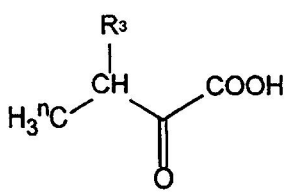
bond to R^1 is present and the hydrogen atom attached to the dotted line bond is absent;

iii) when R^1 is oxygen, R^2 is B and m is zero; and

iv) when R^1 is NH_2, R^3 is hydrogen or $^nCH_3$.

2. A protein, protein fragment, or polypeptide containing an aminoacyl residue derived from a compound according to Claim 1 wherein R^1 is $-NH_2$.

3. A compound of formula Ia



Ia

or a salt thereof, wherein R^3 is hydrogen or $^nCH_3$ and n, at each occurrence is 13 or 14.

4. A compound according to Claim 3 selected from the group consisting of:

2-keto-4-(^{13}C)-butyric acid;

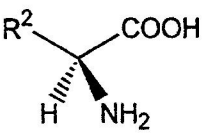
2-keto-3-(^{13}C-methyl)-4-(^{13}C)-butyric acid;

2-keto-4-(^{14}C)-butyric acid; and

2-keto-3-(^{14}C-methyl)-4-(^{14}C)-butyric acid;

or salts thereof.

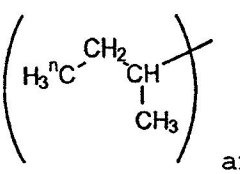
5. A compound of formula Ib



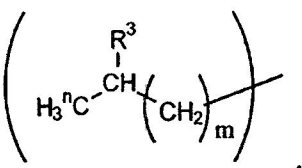
Ib

wherein

R^2 is selected from the group consisting of



and



A **B**

where R^3 is hydrogen or $^nCH_3$; m is zero or one; and n, at each occurrence, is 13 or 14.

6. A compound according to Claim 5 selected from the group consisting of:

L-2-amino-3-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic acid;

L-2-amino-3-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid;

L-2-amino-3-(^{13}C-methyl)-5-(^{13}C)-butanoic acid;

L-2-amino-3-(^{14}C-methyl)-5-(^{14}C)-butanoic acid;

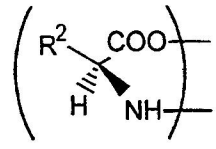
L-2-amino-4-(^{13}C-methyl-5-(^{13}C)-pentanoic acid;

and

L-2-amino-4-(^{14}C-methyl-5-(^{14}C)-pentanoic acid;

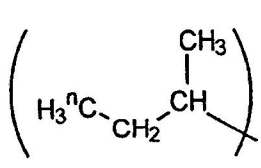
or salts thereof.

7. A protein, protein fragment, or polypeptide containing one or more aminoacyl residues, wherein said one or more amino acyl residues comprise a compound of formula IIb



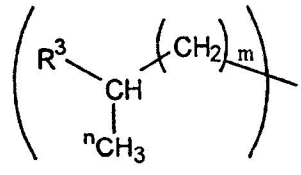
IIb

wherein R^2 is selected from the group consisting of



A

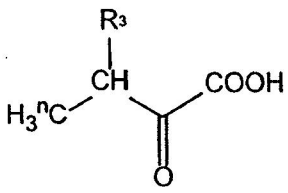
and



B

wherein R^3 is hydrogen or $^nCH_3$; m is zero or one; and n, at each occurrence, is 13 or 14.

8. A method of preparing a compound of formula Ia

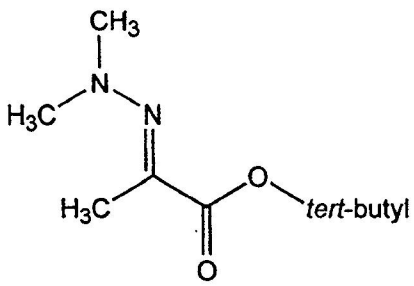


Ia

or a salt thereof, wherein R^3 is selected from the group consisting of hydrogen and $^nCH_3$, and n at each occurrence is 13 or 14,

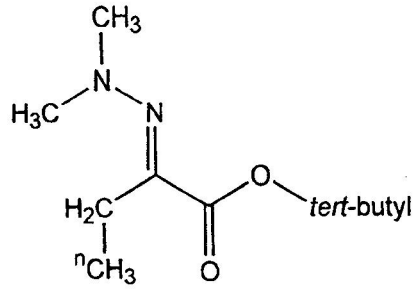
which comprises

a) reacting a compound of formula IV



IV

with isotopically-labeled methyl iodide ($H_3{}^nCI$) to produce a compound of formula V



V

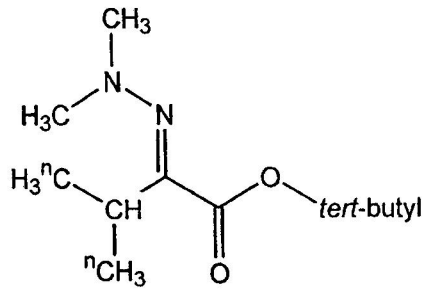
and

b) removing the *tert*-butyl ester and dimethylhydrazino groups to produce 2-keto-4-(^{n}C)-butyric acid.

9. A method according to Claim 8, which further comprises salifying the reaction product of step b).

10. A method according to Claim 8, which further comprises

c) reacting the product of step b) with isotopically-labeled methyl iodide ($H_3{}^nCI$), where n is 13 or 14, to produce a compound of formula VI



VI

and

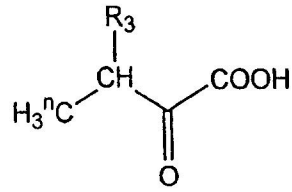
d) removing the *tert*-butyl ester and dimethylhydrazino groups to produce 2-keto-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid.

11. A method according to Claim 10, which further comprises salifying the reaction product of step d).

12. A method of preparing a protein, protein fragment, or polypeptide containing at least one amino acyl residue selected from the group consisting of 4-(^{n}C-methyl)-5-(^{n}C)-leucyl, 5-(^{n}C)-isoleucyl, and 3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-valyl, which comprises

a) genetically modifying a suitable microorganism to express said protein, protein fragment, or polypeptide;

b) culturing said genetically modified microorganism in a nutrient medium containing a compound of formula Ia



Ia

or salt thereof, wherein n, at each occurrence is 13 or 14, and R^3 is hydrogen or $^nCH_3$; and

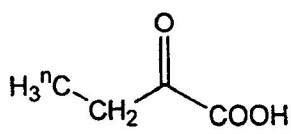
c) isolating said protein, protein fragment, or polypeptide.

13. A method of preparing a protein, protein fragment, or polypeptide containing at least one 3-methyl-5-(^{n}C)-isoleucyl aminoacyl residue,

which comprises

a) genetically modifying a suitable microorganism to express said protein, protein fragment, or polypeptide;

b) culturing said genetically modified microorganism in a nutrient medium containing a compound of formula Ia"



Ia"

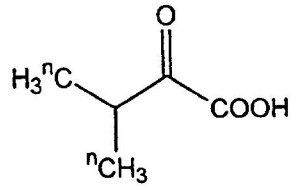
or a salt thereof, wherein n, at each occurrence is 13 or 14; and

c) isolating said protein, protein fragment, or polypeptide.

14. A method of preparing 2-amino-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid which comprises

a) genetically modifying a suitable microorganism to express a homopolymer of valine;

b) culturing said genetically modified microorganism in a nutrient medium containing a compound of formula Ia'



Ia'

or a salt thereof, where n, at each occurrence, is 13 or 14;

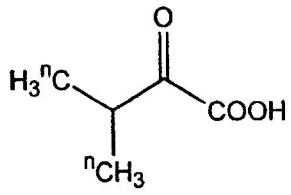
c) isolating the homopolymer of valine expressed by said genetically modified microorganism; and

d) fragmenting said homopolymer to produce 2-amino-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid.

15. A method of preparing 2-amino-4-(^{n}C-methyl)-5-(^{n}C)-pentanoic acid which comprises

a) genetically modifying a suitable microorganism to express a homopolymer of leucine;

b) culturing said genetically modified microorganism in a nutrient medium containing a compound of formula Ia'



Ia'

or a salt thereof, where n, at each occurrence, is 13 or 14;

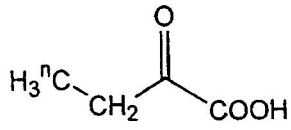
c) isolating the homopolymer of leucine expressed by said genetically modified microorganism; and

d) fragmenting said homopolymer to produce 2-amino-4-(^{n}C-methyl)-5-(^{n}C)-pentanoic acid.

16. A method of preparing 2-amino-3-methyl-5-(^{n}C)-pentanoic acid which comprises

a) genetically modifying a suitable microorganism to express a homopolymer of isoleucine;

b) culturing the genetically modified microorganism in a nutrient medium containing a compound of formula Ia"



Ia"

or a salt thereof, where n, at each occurrence, is 13 or 14;

c) isolating the homopolymer of isoleucine expressed by said genetically modified microorganism; and

d) fragmenting said homopolymer to produce 2-amino-3-methyl-5-(^{n}C)-pentanoic acid.

Abstract of the Disclosure

Site-specific isotopically-labeled valine, leucine, and isoleucine and biosynthetic precursors for these amino acids are provided. The amino acids are labeled with ^{13}C or ^{14}C at the methyl group carbon atom(s) most remote from the carboxyl group. Also disclosed are the biochemical precursors of these labeled amino acids, 2-keto-4-(^{n}C)butyric acid and 2-keto-3-(^{n}C-methyl)-4-(^{n}C)-butyric acid in which n, at each occurrence, is 13 or 14.

Also disclosed are proteins, protein fragments, and polypeptides containing these site-specifically isotopically labeled amino acids, and methods for preparing the biochemical precursors, the amino acids, and the proteins, protein fragments, and polypeptides.

SEQUENCE LISTING

<110> Augeri, David J.
Fesik, Stephen F.

<120> Site-Specific Isotopically-Labeled Proteins, Amino Acids, and Biochemical Precursors Therefor

<130> 6470.US.01

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 174
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 81-256 Catalytic region of human stromelysin.

<400> 1

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

Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Phe
115 120 125
His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Leu Tyr His Ser Leu
130 135 140
Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn Gly Ile
145 150 155 160
Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
165 170

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 2
gaaatgaaga gtcttcaa 18

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 3
gcgtcccagg ttctggag 18

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 4
taccatggcc tatccattgg atggagc 27

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer sequence

<400> 5
ataggatcct taggtctcag gggagtcagg 30

6660170 "2 15 06 20 0

inventor's certificate.

NONE

The following foreign applications for patent or inventor's certificate have a filing date earlier than the filing date of the applications identified above.

NONE

Claim to benefit of earlier U.S. application(s) as follows:

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. §120 of the following earlier-filed United States patent applications. Insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior U.S. applications in the manner required by 35 U.S.C. §112, first paragraph, I acknowledge a duty to disclose to the Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability as defined in 37 C.F.R. §1.56 which came into existence between the filing date(s) of the prior applications and the national or PCT filing date of this application.

NONE

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

NONE

I hereby appoint the following Attorneys and/or agents to prosecute this application and any continuation or divisional applications based hereon, and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith:

Mona Anand, Reg. No. 34,537
Regina M. Anderson, Reg. No. 35,820
Mark C. Bach, Reg. No. 34,766
Cheryl L. Becker, Reg. No. 35,441
Thomas D. Brainard, Reg. No. 32,459
Dianne Casuto, Reg. No. 40,943
Portia Chen, Reg. No. P44,075
Steven R. Crowley, Reg. No. 31,604
Andreas M. Danckers, Reg. No. 32,652
J. Michael Dixon, Reg. No. 32,410
Mimi C. Goller, Reg. No. 39,046
Matthew R. Hooper, Reg. No. 31,108
Daniel J. Hulseberg, Reg. No. 36,554
Neal D. Marcus, Reg. No. 35,267
James D. McNeil, Reg. No. 26,204
Lawrence S. Pope, Reg. No. 26,791
Nicholas A. Poulos, Reg. No. 30,209
Dugal S. Sickert, Reg. No. 33,784
Gregory W. Steele, Reg. No. 33,796
Janelle D. Strode, Reg. No. 34,738
Michael J. Ward, Reg. No. 37,960
David L. Weinstein, Reg. No. 28,128
Steven F. Weinstock, Reg. No. 30,117
Brian R. Woodworth, Reg. No. 33,137
Paul D. Yasger, Reg. No. 37,477

Send correspondence to: Steven F. Weinstock
Abbott Laboratories
D-377/AP6D
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500

Direct telephone calls to: Janelle D. Strode
(847) 937-4395

INVENTORS

Name: (first, middle, last): Stephen W. Fesik
Post Office Address: 1099 Portsmouth Circle
Gurnee, IL 60031
Residence: 1099 Portsmouth Circle
Gurnee, IL 60031
Citizenship: United States of America

Name: (first, middle, last): David J. Augeri
Post Office Address: 6846 Third Avenue
Kenosha, WI 53143
Residence: 6846 Third Avenue
Kenosha, WI 53143
Citizenship: United States of America

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that all statements made herein were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title

18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Stephen W. Fesik 3/18/99

Stephen W. Fesik Date

David J. Augeri 3-18-99

David J. Augeri Date

DECLARATION

111

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: D.J.Augeri et al.

Serial No.: Not assigned yet

Filed:

Title: Site-Specific Isotopically Labeled Proteins, Amino Acids and Biochemical Precursors Therefor

Case No.:6470.US.01

Group Art No.: Not assigned yet

Examiner: Not assigned yet

Express Mail Label No.: EE835515564US
I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as Express Mail in an envelope addressed to the:
Box Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231, on:
Date of Deposit: April 9,1999

Kathleen T. Litz 4/9/99
Kathleen T. Litz Date

Declaration and Power of Attorney for a United States Patent Application

As a below-named inventor, I hereby declare that I believe I am the original, first and joint inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled Site-Specific Isoyopically Labeled Proteins, Amino acids and Precursors, the specification of which is enclosed herewith.

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-mentioned specification, including the claims.

I acknowledge a duty to disclose to the Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56.

Claim to benefit of foreign application(s) as follows:

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. §119

inventor's certificate.

NONE

The following foreign applications for patent or inventor's certificate have a filing date earlier than the filing date of the applications identified above.

NONE

Claim to benefit of earlier U.S. application(s) as follows:

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. §120 of the following earlier-filed United States patent applications. Insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior U.S. applications in the manner required by 35 U.S.C. §112, first paragraph, I acknowledge a duty to disclose to the Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability as defined in 37 C.F.R. §1.56 which came into existence between the filing date(s) of the prior applications and the national or PCT filing date of this application.

NONE

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

NONE

I hereby appoint the following Attorneys and/or agents to prosecute this application and any continuation or divisional applications based hereon, and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith:

Mona Anand, Reg. No. 34,537
Regina M. Anderson, Reg. No. 35,820
Mark C. Bach, Reg. No. 34,766
Cheryl L. Becker, Reg. No. 35,441
Thomas D. Brainard, Reg. No. 32,459
Dianne Casuto, Reg. No. 40,943
Portia Chen, Reg. No. P44,075
Steven R. Crowley, Reg. No. 31,604
Andreas M. Danckers, Reg. No. 32,652
J. Michael Dixon, Reg. No. 32,410
Mimi C. Goller, Reg. No. 39,046
Matthew R. Hooper, Reg. No. 31,108
Daniel J. Hulseberg, Reg. No. 36,554
Neal D. Marcus, Reg. No. 35,267
James D. McNeil, Reg. No. 26,204
Lawrence S. Pope, Reg. No. 26,791
Nicholas A. Poulos, Reg. No. 30,209
Dugal S. Sickert, Reg. No. 33,784
Gregory W. Steele, Reg. No. 33,796
Janelle D. Strode, Reg. No. 34,738
Michael J. Ward, Reg. No. 37,960
David L. Weinstein, Reg. No. 28,128
Steven F. Weinstock, Reg. No. 30,117
Brian R. Woodworth, Reg. No. 33,137
Paul D. Yasger, Reg. No. 37,477

Send correspondence to: Steven F. Weinstock
Abbott Laboratories
D-377/AP6D
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500

Direct telephone calls to: Janelle D. Strode
(847) 937-4395

INVENTORS

Name: (first, middle, last): Stephen W. Fesik
Post Office Address: 1099 Portsmouth Circle
Gurnee, IL 60031
Residence: 1099 Portsmouth Circle
Gurnee, IL 60031
Citizenship: United States of America

Name: (first, middle, last): David J. Augeri
Post Office Address: 6846 Third Avenue
Kenosha, WI 53143
Residence: 6846 Third Avenue
Kenosha, WI 53143
Citizenship: United States of America

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that all statements made herein were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title

18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Stephen W. Fesik 3/18/99
Stephen W. Fesik Date

David J. Augeri 3-18-99
David J. Augeri Date

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: D.J.Augeri et al.

Serial No.: Not assigned yet

Filed:

Title: Site-Specific Isotopically Labeled Proteins, Amino Acids and Biochemical Precursors Therefor

Case No.:6470.US.01

Group Art No.: Not assigned yet

Examiner: Not assigned yet

Express Mail Label No.: EE835515564US

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as Express Mail in an envelope addressed to the: Box Patent Application Assistant Commissioner for Patents Washington, D.C. 20231, on: Date of Deposit: April 9,1999

Kathleen T. Litz 4/9/99
Kathleen T. Litz Date

Declaration and Power of Attorney for a United States Patent Application

As a below-named inventor, I hereby declare that I believe I am the original, first and joint inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled Site-Specific Isoyopically Labeled Proteins, Amino acids and Precursors, the specification of which is enclosed herewith.

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-mentioned specification, including the claims.

I acknowledge a duty to disclose to the Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56.

Claim to benefit of foreign application(s) as follows:

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. §119

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: David J. Augeri et al.

Serial No.:

Filed:

For: SITE-SPECIFIC ISOTOPICALLY LABELED PROTINS, AMINO ACIDS AND BIOCHEMICAL PRECURSORS THERFOR

Attorney Docket No.: 6470.US.01

Date: April 9, 1999

EXPRESS MAIL NO.: EE83551645US

Certificate of Mailing under 37 CFR §1.10:
I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail Post Office to Addressee Service on the date shown below with sufficient postage in an envelope addressed to:

Box Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231, on April 9, 1999:

Date of Deposit:

Kathleen T. Litz 4/9/99
Kathleen T. Litz Date

STATEMENT TO SUPPORT FILINGS AND SUBMISSIONS IN ACCORDANCE WITH 37 C.F.R. §§1.821 THROUGH 1.825

Box Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D. C. 20231

Dear Sir:

The undersigned, being the attorney of record of the above-identified patent application, submits the following statement regarding the Sequence Listing in paper and computer readable form:

I hereby state that the content of the paper and computer readable copies of the Sequence Listing, submitted in accordance with 37 C.F.R. §1.821(c) and (e), respectively, are the same.

Respectfully submitted,
David J. Augeri et al.

Janelle D. Strode
Registration No. 34,738
Attorney for Applicants

ABBOTT LABORATORIES
D-0377/AP6D-2
100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500
Telephone: (847) 938-3137
Facsimile: (847) 938-2623

09505145 040999

121.
117

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025250 00000000
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:28:31
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 120

Industria y Comercio

CORRESPONDENCIA

REQUISITOS MINIMOS

PATENTE DE INVENCIÓN [ ] **MODELO DE UTILIDAD [ ]**

- Nombre e identificación del Solicitante [ ]
- Nombre e identificación del Inventor [ ]
- Título o nombre de la Invención [ ]
- Descripción [ ]
- Reivindicaciones [ ]
- Resumen [ ]
- Comprobante de Pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Nombre e identificación del peticionario [ ]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [ ]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [ ]
- Representación gráfica [ ]
- Comprobante de pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

_____.
Firma Responsable

Fecha:_____.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

122

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

118

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-25250

Fecha: 7 de abril del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 19 de octubre de 1987, del folio 54058 al folio 54062 del libro de Protocolo N° 180 , obra el poder N° 11.700 conferido por ABBOTT LABORATORIES

domiciliado(a) en Abbott Park - Illinois. E.U.A.

al doctor JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los mismos.

Facultad para desistir si.

Revisado MFTA.

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

123.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

119

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

2000-04-07

430.

EXPEDIENTE 00-25250

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [x] **NO [ ]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS:

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [x] **NO [ ]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [x] **NO [ ]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 7 de abril del 2000.

MTA.

EXAMINADOR JURIDICO

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

110

formade.344

Folio 124

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

2000-06-27
430

CONCEPTO TECNICO 976
EXPEDIENTE 00 025.250
IPC A61K 31/195 // 38/16 ;
C12N 15/00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
SI [X] NO [ ] Contiene el resumen con el objeto o finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
SI [X] NO [ ] Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).

SI [ ] NO [ ] Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
SI [ ] NO [ ] Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 /94).
SI [ ] NO [ ] Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
SI [X] NO [ ] Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).

SI [X] NO [ ] Contiene el extracto y cumple con los requisitos para publicación (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [ ] NO [X] Contiene el arte final del dibujo característico y cumple con los requisitos (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ] Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ] Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).

SI [ ] NO [X] CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [X] NO [ ] ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C.,
Junio 27, 2000

EXAMINADOR TECNICO DE PATENTES
202007

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TECNICO	976
EXPEDIENTE	00 025.250
IPC	A 61 K 31/195 // 38/16; C 12 N 15/00

Realizado el primer examen de forma de esta solicitud se hacen las siguientes observaciones:

1. Las reivindicaciones 1, 3, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, que son independientes unas de otras, no parecen mantener el principio de la unidad de invención entre sí. Hacer las aclaraciones pertinentes.

2. Debe adjuntarse el arte final de la fórmula química característica en papel fotográfico o papel mantequilla, tamaño 12 X 12 cm, por duplicado. Y otro, tamaño 6 X 6 cm, para la tarjeta del archivo temático.

EXAMINADOR TECNICO DE PATENTES 202007	JEFE DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES	Santa Fe de Bogotá, D.C. Junio 27, 2000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

122

2000-07-13

1130

EXPEDIENTE 00-25250

AUTO 1021

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor José Antonio Lloreda, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 11 JUL 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 13 JUL 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia