SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 15-197741- -00000-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-031427- -00010-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:23 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 5

Industria y Co

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

T=F=5

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** DIVISIONAL

54. **TÍTULO** POLIPÉPTIDOS DE RELAXINA MODIFICADOS Y SUS USOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** AMBRX, INC.

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS.

74. **APODERADO** ALVARO CORREA.

22. **BOGOTÁ, D.C.,** 24. AGOSTO DE 2015.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-031427- -00010-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:23 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 15-197741- -00000-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:24 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

n

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ■ **División** ☐ **Fusión**

■ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ■

Ambrx, Inc.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ■

Documento de identificación: ☐C.C. ☐C.E. ☐NIT ☐Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular		Ciudad
Estados Unidos de América	10975 North Torrey Pines Road, Suite 100 La Jolla, CA 92037		California
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**	
notificacionesbm.bogota@bakermckenzie.com			

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

Correa Ordoñez, Alvaro	79.143.366	20.281
Apellidos y Nombre	**Documento de identificación**	**Tarjeta profesional**

Dirección y domicilio		Ciudad
AV. 82 No. 10 62 Piso 6		Bogotá
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificacionesbm.bogota@bakermckenzie.com	3762211	6341500

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

2

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____ De: _____ A: _____	Expediente **13.031.427** De: _____ A: _____	Expediente_____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Alvaro Correa Ordoñez	
Nombre y apellidos	Firma
C.C. **79.143.366**	Tarjeta Profesional **20.281**

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

2015/063

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0055549

Bogotá D.C., Mayo 19 de 2015 - 16:38:02

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	673666383	14/05/2015	112.425.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1603 INVOCAR LA NOTORIEDAD DENTRO DE UN TRAMITE DE OPOSICION	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-031427- -00010-0000
Fecha: 2015-08-24 16:57:23 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 15-197741- -00000-0000
Fecha: 2015-08-24 16:57:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0092913

Bogotá D.C., Agosto 24 de 2015 - 16:18:25

RECIBIDO DE : BAKER NI 900.532.339 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	14885	05/02/2015	23.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	91296	19/08/2015	54.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	91297	19/08/2015	54.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	138351	24/12/2014	21.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	138352	24/12/2014	21.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
3	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	96.000.00
				$96.000.00

SON: **NOVENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-031427- -00010-0000
Fecha: 2015-08-24 16:57:23 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7
No. 15-197741- -00000-0000
Fecha: 2015-08-24 16:57:24 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	**TESTIGO DOCUMENTAL**	Folio: 5

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL	**Código**	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES	**Código**	2020
Tipo de Radicación: Entrada: **X** Salida: □ Traslado: □ Convenio: □		
Radicador:		

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 13-31427-10 15-197741-0	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: cd	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
Nº. de rodante:		
Nº. de estante:		
N°. de archivador:		
Nº. de entrepaño:		
Nº. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El CD contiene 5 archivos en formato PDF procesados y cargados al sistema

Andres

Unidad de Conservación

- ○ Bolsa
- ○ Caja
- ○ Libro
- ○ Sobre
- ○ Tomo
- ○ Otro

Soporte Documental

- ✓ CD
- ○ Disquete
- ○ DVD
- ○ Folleto
- ○ Periódico
- ○ Plano
- ○ Publicación Periódica
- ○ USB
- ○ Otro

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-031427- -00010-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:23 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 15-197741- -00000-0000

Fecha: 2015-08-24 16:57:24 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ■ Indicación que se solicita una PCT
- ■ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ■ Dibujos de ser estos pertinentes
- ■ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ■ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Polipéptidos de relaxina modificados y sus usos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

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

del corazón, provocan una mayor, y más frecuente, demanda de descompensación sobre el miocardio funcional restante.

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

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

Por ejemplo, los diuréticos disminuyen las concentraciones plasmáticas de potasio y magnesio, y aumentan

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

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

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

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

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

Se ha purificado la relaxina de diversas especies incluso porcina, murina, equina, tiburón, tigre, rata, cazón

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

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

Peptide Symposium, Deber, C. M. y col. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985).

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

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

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona polipéptidos de relaxina opcionalmente modificados con al menos un aminoácido

codificado no natural. La presente especificación proporcionará algunas realizaciones, sin embargo, se debe apreciar que estas realizaciones tienen el propósito de ilustrar la invención y no se debe considerar que limiten el alcance de la invención definido por las reivindicaciones.

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

En un aspecto, la invención se refiere a un método para promover la angiogénesis en un mamífero que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de relaxina. En otras realizaciones, se administra la relaxina en una cantidad suficiente para mantener una concentración sérica de al menos aproximadamente 1 ng/ml. En otra realización, el polipéptido de relaxina es relaxina humana (hR2).

La presente invención proporciona métodos para tratar individuos con distensibilidad arterial disminuida con una cantidad eficaz de una formulación que comprende un agonista del receptor de relaxina. En una realización preferida, el agonista del receptor de relaxina es una relaxina humana recombinante, p. ej., relaxina H2 humana.

En una realización de la invención, la invención proporciona un método para aumentar la distensibilidad

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

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

En otras realizaciones, el sujeto al cual se le administra relaxina sufre de uno o más de los siguientes

trastornos: aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, cardiopatía coronaria, esclerodermia, apoplejía, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia e hipercolesterolemia. En realizaciones relacionadas, la invención proporciona métodos para aumentar la distensibilidad arterial en mujeres perimenopáusicas, menopáusicas y posmenopáusicas y en individuos con riesgo de sufrir alguno de los trastornos mencionados anteriormente.

En otra realización de la invención, la administración de relaxina aumenta la distensibilidad arterial en al menos el 10%, 15%, 20% o más, con respecto a la distensibilidad arterial medida antes de la administración. En otras realizaciones, la invención proporciona la administración de relaxina a individuos con distensibilidad arterial disminuida a una tasa predeterminada para mantener una concentración sérica de relaxina de 0,5 a 80 ng/ml. En una realización, la relaxina es relaxina humana recombinante con un aminoácido codificado no natural. En otra realización, la relaxina es relaxina con más de un aminoácido codificado no natural. En otra realización de la presente invención, la relaxina tiene

un aminoácido codificado no natural unido a un polímero soluble en agua. En realizaciones relacionadas, la relaxina se puede administrar diariamente, en una formulación inyectable, como una formulación de liberación progresiva o como una infusión continua.

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

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para usar los polipéptidos de relaxina de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección o herida isquémica o para la fabricación de un medicamento para la promoción de la angiogénesis. En otro aspecto, la presente invención se refiere al tratamiento de la disfunción de la articulación osteodegenerativa y en otro aspecto el tratamiento de la disfunción de la articulación osteodegenerativa comprende hR2 además de uno o más adyuvantes, incluso, entre otros, glucosamina. En otro aspecto, la presente invención se refiere al tratamiento del mal de Alzheimer y en otro aspecto el tratamiento del mal de Alzheimer comprende hR2 además de

uno o más adyuvantes, incluso, entre otros, estrógeno. En otra realización, la presente invención se refiere a un método para modular la fisiología reproductiva de mamíferos que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del presente.

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

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

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

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

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

La invención proporciona además un método para aumentar la hiperfiltración y la vasodilatación renal que generalmente comprende administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina. Estos métodos son útiles para tratar diversas patologías renales. En consecuencia, la invención

proporciona además métodos para tratar una patología renal relacionada con la vasoconstricción.

La invención proporciona además un método para reducir la hipertensión pulmonar que generalmente comprende administrar una formulación que comprende una cantidad de relaxina.

En las patentes cedidas a Connetics Corporation y a BAS Medical, Inc, patentes estadounidenses número 6.211.147 y 6.780.836 respectivamente, que se incorporan al presente por referencia, se divulgaron métodos para promover la angiogénesis utilizando relaxina. En una patente cedida a Genentech, Inc., patente número 5.759.807, que se incorpora al presente por referencia, se divulga un proceso para la producción procariota de relaxina a partir de prorrelaxina. La patente estadounidense de Yue 6.251.863 divulga métodos para tratar la disfunción de la articulación osteodegenerativa y métodos para tratar el mal de Alzheimer mediante la administración de medicamentos de relaxina que además comprenden sulfato de glcosamina y estrógeno, respectivamente para cada una de las afecciones, y la especificación de esta patente también se incorpora al presente en su totalidad por referencia.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más modificaciones postraduccionales. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina está unido

a un ligador, un polímero o una molécula activa desde el punto de vista biológico. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina está unido a un polímero bifuncional, un ligador bifuncional o al menos a un polipéptido de relaxina adicional.

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

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

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende al menos dos aminoácidos unidos a un polímero soluble en agua que comprende una fracción de

poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, al menos un aminoácido es un aminoácido codificado no natural.

En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina, análogos de relaxina, prorrelaxina, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, relaxina Ala1Asp o polipéptidos de relaxina: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID N.°: 4) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (SEQ ID N.°: 5 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 6). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo

carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 2 o 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 3).

En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 1 (SEQ ID N.°:4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 5 (SEQ ID N.°:4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena B en la posición de aminoácido 7 (SEQ ID N.°:5 o SEQ ID N.°: 6). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 2 (SEQ ID N.°:4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 13 (SEQ

ID N.°:4). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena B en la posición de aminoácido 5 (SEQ ID N.°:5 o SEQ ID N.°: 6). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena A en la posición de aminoácido 18. En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena B en la posición de aminoácido 5. En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la cadena B en la posición de aminoácido 28. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 2, 5, 13, 18 (SEQ ID N.°: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, SEQ ID N.°: 2, SEQ ID N.°: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 2, 5, 13 (SEQ ID N.°: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, SEQ ID N.°: 2, SEQ ID N.°: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 1, 2, 5 (SEQ ID N.°: 4

o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, SEQ ID N.°: 2, SEQ ID N.°: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en la posición de aminoácido 2 o 5 (SEQ ID N.°: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, SEQ ID N.°: 2, SEQ ID N.°: 3 u otras secuencias de relaxina conocidas).

En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena B en la posición de aminoácido 5 o 7 (SEQ ID N.°: 5 o SEQ ID N.°: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2 o 3). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la posición 7 en la cadena B (SEQ ID N.°: 5 o SEQ ID N.°: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2 o 3). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la posición 5 en la cadena B (SEQ ID N.°: 5 o SEQ ID N.°: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2 o 3). En algunas realizaciones, se incorpora un aminoácido codificado no natural en la posición 7 en la cadena B (SEQ ID N.°: 5 o SEQ

ID N.°: 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2 o 3).

En una realización, se incorpora un aminoácido codificado no natural en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en las posiciones de aminoácidos 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID N.°: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3), en la cadena B en las posiciones de aminoácidos 7, 5 (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en los polipéptidos de relaxina: en la cadena A en las posiciones de aminoácidos 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID N.°: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3), en la cadena B en las posiciones de aminoácidos 7, 5 (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3).

En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras, las posiciones: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y

cualquier combinación de estos (SEQ ID N.°: 4 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (SEQ ID N.°: 5 o 6 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras: en la cadena A 1, 2, 5, 13, 18 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras: en la cadena A 1, 2, 5 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras: en la cadena A 2, 5 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras: en la cadena A 2, 5, 13, 18 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en

secuencias de relaxina conocidas). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras: en la cadena B 5, 7 (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en la posición 5 en la cadena B (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3) está unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en la posición 7 en la cadena B (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3) está unido a un polímero soluble en agua.

En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina: posiciones en la cadena B 5, 7 (SEQ ID N.°: 5 o 6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3) y posiciones en la cadena A 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID N.°: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en cualquiera de los polipéptidos de relaxina o prorrelaxina: posiciones en la cadena B 5, 7 (SEQ ID N.°: 5 o

6 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3) y posiciones en la cadena A 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID N.°: 4 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2, 3) y el aminoácido codificado no natural está unido a un polímero soluble en agua.

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para promover la angiogénesis, promover la vasodilatación, promover la vasodilatación no hipotensiva, tratar la hipertensión, incluso, entre otras, la hipertensión renal, hipertensión pulmonar y la hipertensión cardiaca. (Las patentes estadounidenses N.° 6.723.702 y 6.780.836, que se incorporan al presente por referencia en su totalidad, divulgan la formación y el uso de cristales de un análogo de relaxina).

Formulaciones

En la práctica general de la presente invención, también se contempla que una formulación puede contener una mezcla de dos o más de una relaxina, un dímero de relaxina, un análogo de relaxina, una relaxina acilada o un análogo de relaxina acilado con al menos uno de los componentes de una mezcla que contiene un aminoácido codificado no natural. En otra realización de la presente invención, las formulaciones que contienen una mezcla de dos o más de relaxina, un análogo de relaxina, una relaxina acilada o un análogo de relaxina

acilado con al menos uno de los componentes de una mezcla que contiene un aminoácido codificado no natural también incluyen al menos un polímero soluble en agua unido a al menos uno de los aminoácidos codificados no naturales.

La presente invención también incluye mezclas heterogéneas en donde se preparan polipéptidos de relaxina y análogos de relaxina mediante los métodos divulgados en la presente invención y después se mezclan para que se pueda administrar una formulación a un paciente que lo necesite que contiene, por ejemplo, 25% de polipéptido de relaxina que contiene un aminoácido codificado no natural en la posición 28 de la cadena B que ha sido pegilado, 25% de polipéptido de relaxina que contiene un aminoácido codificado no natural en la posición 10 de la cadena B, dicho aminoácido codificado no natural acoplado con un polímero soluble en agua y 50% de polipéptido de relaxina en donde un aminoácido codificado no natural se encuentra en la posición 31 de la cadena B de relaxina (SEQ ID N.°: 2; alternativamente SEQ ID N.°: 4, 6, 8, 10 o 12). Todas las mezclas diferentes de cantidades porcentuales diferentes de variantes de polipéptidos de relaxina en donde los polipéptidos de relaxina incluyen una variedad (1) con PEG de tamaños diferentes o (2) PEG incluidos en diferentes posiciones en la secuencia. Esto es un ejemplo y no debe considerarse de ningún modo que limita las formulaciones que hace posible la presente invención y

que resultarán evidentes para los entendidos en la técnica. En otra realización, las variantes del polipéptido de relaxina para incluir en la mezcla de formulación se elegirán por sus períodos de disociación variables, de modo que la formulación pueda proporcionar una liberación progresiva de relaxina para un paciente que lo necesite.

Las formulaciones de la presente invención pueden incluir un glucagón.

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

En otra realización de la presente invención, es posible utilizar la tecnología divulgada aquí para la producción de análogos de relaxina con propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas aumentadas para uso en pacientes a través de administración al pulmón, que producen niveles elevados de relaxina en sangre que se mantienen durante al menos 6 horas, y más típicamente durante al menos 8, 10, 12, 14, 18, 24 horas o más después de la administración. Otra realización de la presente invención, permite el diseño de mezclas beneficiosas de análogos de relaxina adecuadas para formulaciones terapéuticas para administrar a pacientes como un inhalante.

En algunas realizaciones de la presente invención, se pueden sustituir los siguientes sitios en la molécula de relaxina nativa con aminoácidos codificados no naturales y

opcionalmente se pueden modificar más mediante la unión covalente de un polímero soluble en agua como PEG: los 2 extremos carboxilo terminales de las cadenas A y B, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B y Glu21B.

Además de la relaxina nativa, la presente invención proporciona polipéptidos de relaxina no nativa y análogos de relaxina no nativa que tienen uno o más aminoácidos codificados no naturales sustituidos o insertados en la secuencia señal que también puede proporcionar un sitio para la incorporación de uno o más polímeros solubles en agua como PEG. Esta realización de la invención resulta especialmente útil para introducir otros sitios de pegilación adaptados dentro de la molécula de relaxina, por ejemplo, para formar una PEG-relaxina que tiene una resistencia mejorada a la degradación enzimática. Este enfoque proporciona mayor flexibilidad en el diseño de un conjugado de relaxina optimizado que tiene el equilibrio deseado de actividad, estabilidad, solubilidad y propiedades farmacológicas. Se pueden realizar mutaciones, es decir, mediante mutagénesis específica del sitio, en cualquier cantidad de posiciones dentro de la molécula de relaxina. Los PEG para usar en la presente invención pueden poseer diversas estructuras: lineal, bifurcada, ramificada, tipo mancuerna y similares. Típicamente, PEG es activado con un grupo activador adecuado apropiado para acoplar uno o más sitios deseados en la

molécula de relaxina. Un PEG activado poseerá un grupo reactivo en un extremo terminal para la reacción con relaxina. Los derivados de PEG activados representativos y los métodos para conjugar estos agentes en un fármaco como relaxina son conocidos en la técnica y han sido descritos más detalladamente en Zalipsky, S. y col., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992)y en Advanced Drug Reviews, 16:157-182 (1995).

En una realización particular de la invención, la porción de PEG del conjugado está ausente en uno o más grupos lipofílicos eficaces para modificar significativamente la naturaleza soluble en agua del polímero o del conjugado polímero-relaxina. Es decir, la fracción de polímero o la porción no relaxina de un conjugado de la invención puede contener un grupo de átomos que se considera que es más lipofílico que hidrofílico (p. ej., una cadena de carbono que tiene de aproximadamente 2 a 8-12 átomos de carbono), sin embargo, si la presencia de dicho grupo o grupos no resulta eficaz para modificar significativamente la naturaleza hidrofílica del polímero o del conjugado, entonces dicha fracción puede estar contenida en los conjugados de la invención. Es decir, a través de mutaciones específicas del sitio de relaxina, polipéptidos de relaxina y análogos de

relaxina, un conjugado de relaxina de la invención mismo puede ser hidrofílico, en lugar de lipofílico o anfifílico. En determinadas realizaciones de la invención en donde una fracción lipofílica puede estar presente, preferentemente la fracción no se ubica en un extremo terminal de una cadena de PEG.

PEG ramificados para usar en los conjugados de la invención incluyen los descritos en la publicación de patente internacional WO 96/21469, cuyo contenido se incorpora expresamente al presente en su totalidad por referencia. Generalmente, los PEG ramificados se pueden representar con la fórmula R(PEG--OH).sub.n, en donde R representa la molécula "núcleo" central y .sub.n representa la cantidad de brazos. Los PEG ramificados tienen un núcleo central desde donde se extienden 2 o más brazos de "PEG". En una configuración ramificada, el núcleo del polímero ramificado posee un único sitio reactivo para la unión a la relaxina. Los PEG ramificados para usar en la presente invención comprenderán típicamente menos de 4 brazos de PEG, y más preferentemente, comprenderán manos de 3 brazos de PEG. Los PEG ramificados ofrecen la ventaja de tener un único sitio reactivo acoplado con una nube de polímeros más densa y grande que sus contrapartes de PEG lineales. Un tipo específico de PEG ramificado se puede representar como (MeO-PEG-).sub.p R--X, en donde p es igual a 2 o 3, R es una

estructura núcleo central como lisina o glicerol que tiene 2 o 3 brazos de PEG unidos, y X representa cualquier grupo funcional adecuado que se activa o que se puede activar para acoplarse a la relaxina. Un PEG ramificado particularmente preferido es mPEG2-NHS (Shearwater Corporation, Alabama) que tiene la estructura mPEG2-lisina-succinimida.

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

Alternativamente, la porción de PEG de un conjugado de PEG-relaxina puede poseer una estructura bifurcada que tiene una fracción ramificada en un extremo de la cadena polimérica y dos grupos reactivos libres (o cualquier múltiplo de 2) unidos a la fracción ramificada para la unión a la relaxina. PEG bifurcados ejemplares se describen en la publicación de patente internacional N.° WO 99/45964, cuyo contenido se incorpora expresamente al presente por referencia. El polietilenglicol bifurcado puede incluir opcionalmente un grupo alquilo o "R" en el extremo opuesto de la cadena polimérica. Más específicamente, un conjugado de PEG-relaxina

bifurcado de acuerdo con la invención tiene la fórmula: R-PEG-L(Y-relaxina)n en donde R es alquil, L es un punto de ramificación hidrolíticamente estable e Y es un grupo de enlace que proporciona el enlace químico del polímero bifurcado con la relaxina, y n es un múltiplo de 2. L puede representar un único grupo de "núcleo", como "--CH--" o puede comprender una cadena de átomos más larga. Grupos L ejemplares incluyen lisina, glicerol, pentaeritritol o sorbitol. Típicamente, el átomo de ramificación particular dentro de la fracción ramificada es carbono.

En una realización particular de la invención, el enlace del PEG bifurcado con la molécula de relaxina, (Y), es hidrolíticamente estable. En una realización preferida, n es 2. Las fracciones Y adecuadas, antes de la conjugación con un sitio reactivo en la relaxina, incluyen, entre otras, ésteres activos, carbonatos activos, aldehídos, isocianatos, isotiocianatos, epóxidos, alcoholes, maleimidas, vinilsulfonas, hidrazidas, ditiopiridinas e iodacetamidas. La selección de un grupo activador adecuado dependerá del sitio de unión deseado en la molécula de relaxina y puede ser determinado fácilmente por un entendido en la técnica. El grupo Y correspondiente en el conjugado de PEG-relaxina resultante es el que resulta de la reacción del polímero bifurcado activado con un sitio reactivo adecuado en la relaxina. La identidad específica de dicho enlace final será

evidente para los entendidos en la técnica. Por ejemplo, si el PEG bifurcado reactivo contiene un éster activado, como un éster de succinimida o maleimida, la conjugación a través de un sitio amina en la relaxina provocará la formación del enlace amida correspondiente. Estos polímeros bifurcados particulares son particularmente atractivos porque proporcionan conjugados que tienen una proporción molar de relaxina a PEG de 2:1 o superior. Estos conjugados tienen menor probabilidad de bloquear el sitio receptor de relaxina sin dejar de proporcionar flexibilidad en el diseño para proteger a la relaxina de la degradación enzimática, p. ej., mediante la enzima que degrada la relaxina.

En una realización relacionada, se puede usar un conjugado de PEG-relaxina bifurcado en la presente invención, representado por la fórmula: R-[PEG-L(Y-relaxina)2]n. En este caso R representa un aminoácido codificado no natural que tiene unido al menos un conjugado de PEG-di-relaxina. Específicamente, los polímeros bifurcados preferidos de acuerdo con este aspecto de la invención son aquellos en los que n se selecciona del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización alternativa, el enlace químico entre el aminoácido no natural dentro de la relaxina, polipéptido de relaxina o análogo de relaxina y el punto de ramificación del polímero puede ser degradable (es decir, hidrolíticamente inestable). Alternativamente, la estructura polimérica puede

contener uno o más enlaces degradables para permitir la generación in vivo de un conjugado de PEG-relaxina que tiene una cadena de PEG más pequeña que en el conjugado administrado inicialmente. Por ejemplo, se puede administrar un conjugado grande y relativamente inerte (es decir, que tiene una o más cadenas de PEG de alto peso molecular unidas, p. ej., una o más cadenas de PEG que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 10.000, en donde el conjugado esencialmente no posee bioactividad), que después en el pulmón o en el torrente sanguíneo, se hidroliza para generar un conjugado bioactivo que posee una porción de la cadena de PEG presente originalmente. Tras la escisión in vivo del enlace degradable hidrolíticamente, la relaxina libre (dependiendo de la posición del enlace degradable) o la relaxina que tiene una pequeña cola de polietileno unida, es liberada y absorbida más fácilmente a través del pulmón o circula en la sangre.

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

Los enlaces escindibles adecuados fisiológicamente incluyen, entre otros, éster, éster carbonato, carbamato, sulfato, fosfato, aciloxialquil éter, acetal y cetal. Estos conjugados deben poseer un enlace escindible fisiológicamente que sea estable después del almacenamiento y la administración. Por ejemplo, un conjugado de PEG-enlace escindible-relaxina debe mantener su integridad tras la fabricación de la composición farmacéutica final, tras la disolución en un vehículo de administración adecuado, si se emplea, y tras la administración independientemente de la vía.

Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una relaxina de cadena única o análogo de relaxina de cadena única.

En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado no natural en la secuencia señal. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado no natural en la secuencia señal para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina divulgados en esta especificación. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones

del aminoácido codificado natural en la secuencia señal, así como una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones del aminoácido codificado no natural en la secuencia señal para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina divulgados en esta especificación. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos no naturales en la secuencia señal o líder para la relaxina o cualquiera de los análogos o polipéptidos de relaxina divulgados en esta especificación.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la afinidad del polipéptido de relaxina por un receptor del polipéptido de relaxina o pareja de unión, incluso, entre otros, una proteína, un polipéptido, una molécula pequeña o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la estabilidad del polipéptido de relaxina en comparación con la estabilidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. La estabilidad o la solubilidad se pueden medir utilizando diversos ensayos conocidos por los entendidos en la técnica. Estos ensayos incluyen, entre otros, SE-HPLC y RP-HPLC. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la inmunogenicidad del polipéptido de relaxina en comparación

con la inmunogenicidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la vida media sérica o el tiempo de circulación del polipéptido de relaxina en comparación con la vida media sérica o el tiempo de circulación de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad en agua del polipéptido de relaxina en comparación con la solubilidad en agua de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la solubilidad del polipéptido de relaxina producido en una célula huésped en comparación con la solubilidad de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la expresión del polipéptido de relaxina producido en una célula huésped o aumenta la síntesis in vitro en comparación con la expresión o síntesis de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. El polipéptido de relaxina que comprende esta sustitución mantiene la actividad agonista y mantiene o mejora los

niveles de expresión en una célula huésped. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que aumenta la resistencia a la proteasa del polipéptido de relaxina en comparación con la resistencia a la proteasa de la relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula la actividad de transducción de señales del receptor de relaxina en comparación con la actividad del receptor tras la interacción con el polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula su unión con otra molécula como un receptor en comparación con la unión del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que modula su actividad antiviral en comparación con la actividad antiviral del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una sustitución, adición o eliminación que potencia su actividad metabolizadora de la glucosa en comparación con la actividad metabolizadora de la

glucosa del polipéptido de relaxina correspondiente sin la sustitución, adición o eliminación.

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

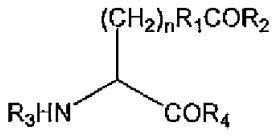
En algunas realizaciones, uno o más enlaces diseñados se crean con uno o más aminoácidos no naturales. El enlace intramolecular se puede crear de muchas formas, incluso, entre otras, una reacción entre dos aminoácidos en la proteína en condiciones adecuadas (uno o ambos aminoácidos pueden ser un aminoácido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

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

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

En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

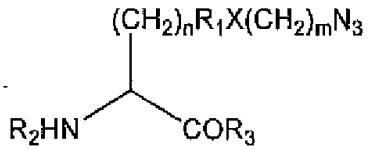
En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo carbonilo. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural tiene la estructura:



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

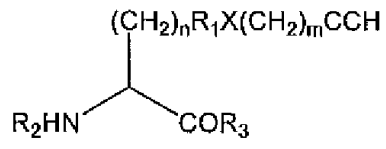
En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo aminooxilo. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo hidrazida. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo hidrazina. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural comprende un grupo semicarbazida.

En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural comprende un grupo azida. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural tiene la estructura:



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

En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo alquino. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural tiene la estructura:



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

En algunas realizaciones, el polipéptido es un agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina comprende un aminoácido codificado no natural unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una fracción de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el agonista, agonista parcial, antagonista, antagonista parcial o agonista inverso del polipéptido de relaxina comprende un aminoácido codificado no natural y una o más modificaciones postraduccionales, ligadores, polímeros o moléculas activas desde el punto de vista biológico.

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibridiza en condiciones estrictas ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de relaxina de SEQ ID N.°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La presente invención también

proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que hibridiza en condiciones estrictas ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de relaxina de SEQ ID N.°: 1 y 2. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden uno o más polinucleótidos que hibridizan en condiciones estrictas a polinucleótidos que codifican los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 en donde el polinucleótido comprende al menos un codón selector. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden uno o más polinucleótidos que hibridizan en condiciones estrictas a polinucleótidos que codifican los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1 y 2 en donde el polinucleótido comprende al menos un codón selector. La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1 y 2. La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1 y 2 con uno o más aminoácidos codificados no naturales. La presente invención también proporciona ácidos

nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido que codifica los polipéptidos que se muestran como SEQ ID N.°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con uno o más aminoácidos codificados no naturales. Resulta evidente para los entendidos en la técnica que diversos polinucelótidos pueden codificar cualquier polipéptido de la presente invención.

En algunas realizaciones, el codón selector se selecciona del grupo que consiste en un codón ámbar, codón ocre, codón ópalo, un codón único, un codón raro, un codón de cinco bases y un codón de cuatro bases.

La presente invención también proporciona métodos para preparar un polipéptido de relaxina unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto un polipéptido de relaxina aislado que comprende un aminoácido codificado no natural con un polímero soluble en agua que comprende una porción que reacciona con el aminoácido codificado no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina es reactivo con respecto a un polímero soluble en agua que de otro modo es no reactivo con respecto a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina es reactivo con respecto a un ligador, polímero o molécula activa desde el punto de vista biológico que de otro modo son

no reactivos con respecto a cualquiera de los 20 aminoácidos comunes.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene carbonilo con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida. En algunas realizaciones, el grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace de carbamato.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar una molécula de poli(etilenglicol) que comprende un grupo carbonilo con un polipéptido que comprende un aminoácido codificado no natural que comprende un grupo aminooxilo, hidrazina, hidrazida o semicarbazida.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene alquino con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende una fracción azida. En

algunas realizaciones, el grupo azida o alquino está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina unido al polímero soluble en agua se prepara haciendo reaccionar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene alzida con una molécula de poli(etilenglicol) que comprende una fracción alquino. En algunas realizaciones, el grupo azida o alquino está unido a la molécula de poli(etilenglicol) a través de un enlace amida.

En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 0,1 kDa y 50 kDa.

En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. En algunas realizaciones, cada rama del polímero ramificado de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de entre 1 kDa y 100 kDa, o entre 1 kDa y 50 kDa.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua unido al polipéptido de relaxina comprende una fracción de polialquilenglicol. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural incorporado en el

polipéptido de relaxina comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina comprende una fracción carbonilo y el polímero soluble en agua comprende una fracción aminooxilo, hidrazida, hidrazina o semicarbazida. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina comprende una fracción alquino y el polímero soluble en agua comprende una fracción azida. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina comprende una fracción azida y el polímero soluble en agua comprende una fracción alquino.

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

La presente invención también proporciona células que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido de relaxina que comprende un codón selector. En algunas realizaciones, las células comprenden una sintetasa ortogonal

de ARN o un ARNt ortogonal para sustituir un aminoácido codificado no natural en el polipéptido de relaxina.

La presente invención también proporciona métodos para preparar un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural. En algunas realizaciones, los métodos comprenden cultivar células que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido de relaxina, una sintetasa ortogonal de ARN o un ARNt ortogonal en condiciones para permitir la expresión del polipéptido de relaxina; y purificar el polipéptido de relaxina a partir de las células o el medio de cultivo.

La presente invención también proporciona métodos para aumentar la vida media terapéutica, la vida media sérica o el tiempo de circulación de los polipéptidos de relaxina. La presente invención también proporciona métodos para modular la inmunogenicidad de los polipéptidos de relaxina. En algunas realizaciones, los métodos comprenden sustituir un aminoácido codificado no natural por uno o más aminoácidos en los polipéptidos de relaxina natural o unir el polipéptido de relaxina a un ligador, un polímero, un polímero soluble en agua o una molécula activa desde el punto de vista biológico.

La presente invención también proporciona métodos para tratar a un paciente que lo necesite con una cantidad eficaz de una molécula de relaxina de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar al

paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural está unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina es glicosilado. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina es no glicosilado.

La presente invención también proporciona polipéptidos de relaxina que comprenden una secuencia que se muestra en SEQ ID N.°: 1 y 2, o cualquier otra secuencia de polipéptidos de relaxina (un ejemplo no exhaustivo de estas serían SEQ ID N.°: 3 a 12) con la diferencia de que al menos un aminoácido está sustituido por un aminoácido codificado no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural está unido a un polímero soluble en agua. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua comprende una fracción de poli(etilenglicol). En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la

secuencia que se muestra en SEQ ID N.°: 1 a 12, o cualquier otra secuencia de polipéptidos de relaxina, en donde al menos un aminoácido está sustituido por un aminoácido codificado no natural. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende una cadena A y B (p. ej. SEQ ID N.°: 1, 2 y 3; SEQ ID N.°: 4 y 5 o 4 y 6 harían la relaxina, etc.), o cualquier otra secuencia de polipéptidos de relaxina, en donde al menos un aminoácido está sustituido por un aminoácido codificado no natural. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID N.°: 1, 2 o 3. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de relaxina que comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID N.°: 1-3. En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural comprende una fracción sacárida. En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua está unido al polipéptido a través de una fracción sacárida. En algunas realizaciones, un ligador, un polímero o una molécula activa desde el punto de vista biológico está unida al polipéptido de relaxina a través de una fracción sacárida.

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

La presente invención proporciona un polipéptido de relaxina que comprende al menos un ligador, un polímero o una molécula activa desde el punto de vista biológico, en donde dicho ligador, polímero o molécula activa desde el punto de vista biológico está unida al polipéptido a través de un grupo funcional de un aminoácido codificado no natural incorporado ribosómicamente en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido es monoPEGilado. La presente invención también proporciona un polipéptido de relaxina que comprende un ligador, un polímero o una molécula activa desde el punto de vista biológico que está unida a uno o más aminoácidos codificados no naturales en donde dichos aminoácidos codificados no naturales están incorporados ribosómicamente en el polipéptido en sitios preseleccionados.

En el alcance de la presente invención, se incluye la secuencia señal o líder de relaxina, un ejemplo de la cual se puede ver como proinsulina. La secuencia señal o líder

heteróloga seleccionada debe ser una secuencia reconocida y procesada, p. ej. mediante el sistema de secreción de la célula huésped, secretada, y posiblemente escindida por una peptidasa señal, por la célula huésped. Un método para tratar una afección o trastorno con relaxina o un polipéptido o análogo de relaxina de la presente invención implica tratar con relaxina con o sin un péptido señal o líder.

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

La figura 7 muestra una gráfica de concentración sérica de relaxina en ratas SD en ng/mL con respecto al tiempo para

polipéptidos de relaxina natural y AV13 PEGilado diferencialmente.

La figura 8(A) muestra una gráfica de la comparación de la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para todos los grupos PEG-RLX dosificados por vía subcutánea en el ejemplo 41. Se administró una inyección de dosis única a cada animal. N=5 animales por grupo. Los símbolos indican el promedio ± SD (desviación estándar) de las concentraciones séricas agrupadas con respecto al tiempo.

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

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

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

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

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

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

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

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

La figura 13(A) muestra una comparación de la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para todos los grupos PEG-RLX dosificados por vía subcutánea o intravenosa. Se administró una inyección de dosis única a cada animal. N=3-5 animales por grupo.

La figura 13(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,25 mg/kg de 20KPEG-AQ1-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=4 animales por grupo.

La figura 14(A) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,5 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=5 animales por grupo.

La figura 14(B) muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía subcutánea con 0,25 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis subcutánea a cada animal. N=3 animales por grupo.

La figura 15 muestra una gráfica de las curvas de concentración sérica animal individual y tiempo para ratas SD dosificadas por vía intravenosa con 0,125 mg/kg de PEG20-AQ1-RLX. Se administró una única dosis intravenosa a cada animal. N=5 animales por grupo.

La figura 16(A) muestra una gráfica de la vida media terminal de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD. La figura 16(B) muestra una gráfica de la AUC_{inf} de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.

La figura 17(A) muestra una gráfica de la Cmax de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.

La figura 17(B) muestra una gráfica de la eliminación de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD.

La figura 18(A) muestra una gráfica del volumen de distribución de PEG-Relaxina promedio en función de la dosis; barras de error =SD. La figura 18(B) muestra una gráfica de una comparación de concentración sérica-tiempo después de una única inyección intravenosa o subcutánea de 0,25 mg/kg de Relaxina 20KPEG-AQ1.

La figura 19 en las partes de (A) a (F) muestra los datos de la fase I del ejemplo 44. La figura 19(A) muestra el efecto de la infusión IV con relaxina natural sobre el consumo de agua y la producción de orina. La figura 19(B) muestra un valor de referencia para cada grupo de ratas Long-Evans de -16 a 0 horas de la fase I para la producción de orina. La figura 19(C) muestra el efecto de la infusión IV con relaxina natural sobre los hematocritos. La figura 19(D)

muestra el efecto de la infusión IV con relaxina natural sobre el BUN plasmático en ratas Long-Evans hembra. La figura 19(E) muestra el consumo de agua para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase I. La figura 19(F) muestra la producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase I.

La figura 20 en las partes de (A) a (I) muestra los datos de la fase II después de la administración de vehículo (grupo de control) y los grupos de prueba con administración de 0,1X, 0,3X y 1X de una variante de 20K PEG-Relaxina con sustitución en la cadena A en la posición 1 con pAF unido a PEG del ejemplo 44. La figura 20(A) muestra el efecto sobre el consumo de agua y la producción de orina. La figura 20 (B) muestra el efecto sobre los niveles de sodio en plasma para cada grupo de ratas Long-Evans después de la inyección. La figura 20 (C) muestra el efecto sobre los niveles de cambio de sodio en plasma para cada grupo de ratas Long-Evans después de la inyección. La figura 20(D) muestra el efecto de PEG-Relaxina sobre la osmolaridad plasmática. La figura 20(E) muestra el efecto de la infusión IV con PEG-Relaxina sobre el cambio en la osmolaridad plasmática. La figura 20(F) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre los niveles de BUN. La figura 20(G) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre el consumo de agua para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase II.

La figura 20(H) muestra el valor de referencia de producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de -16 a 0 horas de la fase II. La figura 20(I) muestra el efecto de la administración de PEG-Relaxina sobre la producción de orina para cada grupo de ratas Long-Evans de 0 a 6 horas de la fase II.

DEFINICIONES

Se entenderá que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las construcciones y los reactivos específicos descritos aquí y como tal puede variar. También se entenderá que se emplea la terminología utilizada aquí con la finalidad de describir las realizaciones particulares exclusivamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención, el cual solo se verá limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Según se emplea aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una “relaxina” o un “polipéptido de relaxina” y diversas formas con guión y sin guión es una referencia a una o más de dichas proteínas e incluye equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que normalmente les asigna el entendido en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí para ejecutar o probar la invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y las patentes mencionadas aquí se incorporan en el presente por referencia con el fin de describir y divulgar, por ejemplo, las construcciones y metodologías que se describen en las publicaciones, que se pueden utilizar con relación a la invención actualmente descrita. Las publicaciones establecidas aquí se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo contenido aquí se interpretará como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder a dicha divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otro motivo.

El término "sustancialmente purificado" se refiere a un polipéptido de relaxina que puede estar sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína tal como se encuentra en su entorno natural, es decir, una célula natural o una célula huésped en el caso de polipéptidos de relaxina producidos por

recombinación. El polipéptido de relaxina que puede estar sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30 %, menos de aproximadamente el 25 %, menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido de relaxina o una variante del mismo se produce por recombinación por las células huésped, la proteína puede estar presente en aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 % o menos del peso seco de las células. Cuando el polipéptido de relaxina o una variante del mismo se produce por recombinación por las células huésped, la proteína puede estar presente en el medio de cultivo en aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4 g/L, aproximadamente 3 g/L, aproximadamente 2 g/L, aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 750 mg/L, aproximadamente 500 mg/L, aproximadamente 250 mg/L, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 10 mg/L o

aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. Por lo tanto, el polipéptido de relaxina "sustancialmente purificado" según se produce a través de los métodos de la presente invención puede tener un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 75 %, el 80 %, el 85 % y más específicamente, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 90 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 95 %, un nivel de pureza de al menos aproximadamente el 99 % o mayor según se determina a través de los método apropiados, por ejemplo el análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

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

plásmido o, alternativamente, puede estar integrado en el genoma del huésped.

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

"Agente reductor", según se emplea aquí con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en el estado reducido y reduce los enlaces disulfuro intramolecular o intermolecular. Los agentes reductores adecuados incluyen,

entre otros, ditiotreitol (DTT), 2- mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteamina (2- aminoetanotiol) y glutatión reducido. Es fácilmente evidente para el entendido en la técnica que una amplia gama de agentes reductores son adecuados para el uso en los métodos y composiciones de la presente invención.

"Agente oxidante", según se emplea aquí con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que puede eliminar un electrón de un compuesto que se está oxidando. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, entre otros, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitol oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Es fácilmente evidente para el entendido en la técnica que una amplia gama de agentes reductores son adecuados para el uso en los métodos de la presente invención.

"Agente desnaturalizante" o "desnaturalizador", según se emplea aquí, se define como cualquier compuesto o material que provocará un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturalizante o desnaturalizador se determinará mediante las propiedades y la concentración del agente desnaturalizante o desnaturalizador particular. Los agentes desnaturalizantes o desnaturalizadores pueden ser caótropos, detergentes, disolventes orgánicos, disolventes miscibles en agua, fosfolípidos o una combinación de dos o

más de dichos agentes. Los caótropos adecuados incluyen, entre otros, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los detergentes útiles pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes, por ejemplo dodecil sulfato de sodio, o éteres de polioxietileno (p. ej. Detergentes Tween o Triton), detergentes no iónicos suaves Sarkosyl, (p. ej., digitonina), detergentes catiónicos suaves, por ejemplo N->2,3-(Dioleioxi)-propil-N,N,N- trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (p. ej. colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes zwitteriónicos incluso, entre otros, sulfobetaínas (Zwittergent), 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS) y 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO). Los disolventes orgánicos, miscibles en agua, por ejemplo acetonitrilo, los alcanoles inferiores (especialmente alcanoles C2-C4, por ejemplo etanol o isopropanol) o los alcanodioles inferiores (especialmente alcanodioles C2-C4, por ejemplo etilenglicol) se pueden utilizar como desnaturalizadores. Los fosfolípidos útiles en la presente invención pueden ser fosfolípidos naturales, por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados o variantes de fosfolípidos sintéticos, por ejemplo dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

"Replegamiento", según se emplea aquí, describe cualquier proceso, reacción o método que transforma el enlace disulfuro que contiene polipéptidos de un estado indebidamente plegado o desplegado a una conformación natural o plegada correctamente con respecto a los enlaces disulfuro.

"Copliegue", según se emplea aquí, se refiere específicamente al proceso de replegamiento, las reacciones o los métodos que emplean al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y producen la transformación de los polipéptidos indebidamente plegados o desplegados a polipéptidos naturales, plegados correctamente.

El término "proinsulina", según se emplea aquí, es una proteína debidamente cruzada adecuada de la fórmula: B-C-A en donde:

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

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

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

El término “análogo de relaxina”, según se emplea aquí, es una proteína debidamente cruzada adecuada que presenta la actividad de la relaxina de la fórmula:

A-B

en donde:

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

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

En la presente especificación, cada vez que se utiliza el término relaxina en un sentido plural o genérico pretende comprender las insulinas naturales y los análogos de relaxina y sus derivados. “Polipéptido de relaxina”, según se emplea aquí, abarca un compuesto que tiene una estructura molecular similar a la de la relaxina humana que incluye los puentes disulfuro entre Cys.sup.A7 y Cys.sup.B7 y entre Cys.sup.A20 y Cys.sup.B19 y un puente disulfuro interno entre Cys.sup.A6 y Cys.sup.A11, y que tiene actividad de la relaxina.

El término “relaxina”, según se emplea aquí, se refiere a la relaxina humana, cuya secuencia de aminoácidos y estructura espacial son conocidas. La relaxina humana consta de una cadena A de veintiún aminoácidos y una cadena B de treinta aminoácidos que están reticuladas por enlaces

disulfuro. Una relaxina debidamente reticulada contiene tres puentes disulfuro: uno entre la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena Ay la posición 19 de la cadena B y un tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A [Nicol, D.S.H.W. y Smith, L. F., Nature, 187, 483-485 (1960)].

Los péptidos de la relaxina incluso, entre otros, relaxina, humana; relaxina, porcina; IGF-I, humana; factor de crecimiento II(69-84) similar a la relaxina; factor de crecimiento II (68-102) similar a la prorrelaxina, humana; factor de crecimiento II (105-128) similar a la prorrelaxina, humana; [AspB28]-relaxina, humana; [LysB28]-relaxina, humana; [LeuB28]-relaxina, humana; [ValB28]-relaxina, humana; [AlaB28]-relaxina, humana; [AspB28, ProB29]-relaxina, humana; [LysB28, ProB29]-relaxina, humana; [LeuB28, ProB29]-relaxina, humana; [ValB28, ProB29]-relaxina, humana; [AlaB28, ProB29]-relaxina, humana; [GlyA21]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3]-relaxina, humana; [AlaA21]-relaxina, humana; [AlaA21 Gin.sup.B3] relaxina, humana; [GlnB3]-relaxina, humana; [GlnB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GluB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; [GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; B22-B30 relaxina, humana; B23-B30 relaxina, humana; B25-B30 relaxina, humana; B26-B30 relaxina, humana; B27-B30 relaxina, humana; B29-B30 relaxina, humana; la cadena A de la relaxina humana y la cadena B de la relaxina humana.

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

Un "análogo de relaxina monomérico" es un análogo de acción rápida de la relaxina humana, incluso, por ejemplo, relaxina humana donde Pro en la posición B28 se sustituye con Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y donde Lys en la posición B29 es Lys o se sustituye con Pro. Otro análogo de relaxina monomérico, también conocido como relaxina humana des(B27), es relaxina humana donde Thr en la posición 27 de la cadena B se elimina. Los análogos de relaxina monoméricos se divulgan en Chance, R. E., y col., patente estadounidense N.°5.514.646, emitida el 7 de mayo de 1996; Brems, D.N., y col. Protein Engineering, 5, 527-533 (1992); Brange, J.J.V., y col., EPO publicación N.°214.826 (publicada el 18 de marzo

de 1987); y Brange, J.J.V., y col., Current Opinion in Structural Biology, 1, 934-940 (1991). Los análogos de relaxina monoméricos empleados en las presentes formulaciones están debidamente reticulados en las mismas posiciones que en la relaxina humana.

Los péptidos de la relaxina incluso, entre otros, relaxina, humana; relaxina, porcina; IGF-I, humana; factor de crecimiento II(69-84) similar a la relaxina; factor de crecimiento II (68-102) similar a la prorrelaxina, humana; factor de crecimiento II (105-128) similar a la prorrelaxina, humana; [AspB28]-relaxina, humana; [LysB28]-relaxina, humana; [LeuB28]-relaxina, humana; [ValB28]-relaxina, humana; [AlaB28]-relaxina, humana; [AspB28, ProB29]-relaxina, humana; [LysB28, ProB29]-relaxina, humana; [LeuB28, ProB29]-relaxina, humana; [ValB28, ProB29]-relaxina, humana; [AlaB28, ProB29]-relaxina, humana; [GlyA21]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3]-relaxina, humana; [AlaA21]-relaxina, humana; [AlaA21 Gin.sup.B3] relaxina, humana; [GlnB3]-relaxina, humana; [GlnB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GluB30]-relaxina, humana; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; [GlnB3 GluB30]-relaxina, humana; B22-B30 relaxina, humana; B23-B30 relaxina, humana; B25-B30 relaxina, humana; B26-B30 relaxina, humana; B27-B30 relaxina, humana; B29-B30 relaxina, humana; la cadena A de la relaxina humana y la cadena B de la relaxina humana.

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

El término "polipéptido de relaxina" también incluye las sales y los profármacos farmacéuticamente aceptables, y los profármacos de las sales, polimorfos, hidratos, solvatos, fragmentos activos desde el punto de vista biológico, variantes activas desde el punto de vista biológico y estereoisómeros de la relaxina natural así como variantes agonistas, miméticas y antagonistas de la relaxina natural y sus fusiones de polipéptidos. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal, en el extremo carboxilo terminal, o en ambos, están comprendidas en el término "polipéptido de relaxina". Fusiones ejemplares

incluyen, entre otros, p. ej., relaxina metionil en la cual una metionina está unida al extremo amino terminal de la relaxina a causa de la expresión recombinante de la forma madura de relaxina que carece de la porción o péptido señal o líder de la misma (una metionina está unida al extremo amino terminal de relaxina causa de la expresión recombinante), fusiones con el fin de purificación (incluso, entre otros, para poli-histidina o epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de unión a albúmina sérica y fusiones con proteínas séricas, por ejemplo albúmina sérica. La patente estadounidense N.°5.750.373, que se incorpora al presente por referencia, describe un método para seleccionar nuevas proteínas, por ejemplo la hormona de crecimiento y las variantes de fragmentos de anticuerpos que tienen propiedades de unión alteradas por sus moléculas del receptor respectivas. El método comprende la fusión de un gen que codifica una proteína de interés al dominio del carboxilo terminal de la proteína de recubrimiento del gen III del fago filamentoso M13. Moléculas quiméricas que comprenden relaxina y otra u otras moléculas. La molécula quimérica puede contener regiones o fragmentos específicos de una o ambas de las relaxina y las otras moléculas. Cualquiera de los fragmentos se puede preparar a partir de proteínas a través de métodos bioquímicos estándar o mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el fragmento. La relaxina, o un

fragmento de la misma, se pueden producir como una proteína de fusión que comprende albúmina sérica humana (HSA), Fc o una porción de este. Dichas construcciones de fusión son adecuadas para mejorar la expresión de la relaxina, o fragmento de la misma, en una célula huésped eucariota. Porciones de HSA ejemplares incluyen el polipéptido del terminal N (aminoácidos 1-369, 1-419 y longitudes intermedias que comienzan con el aminoácido 1), según se divulga en la patente estadounidense N.°5.766.883 y la publicación WO 97/24445, que se incorporan al presente por referencia. Otros polipéptidos quiméricos pueden incluir una proteína de HSA con relaxina, o fragmentos de esta, unida a cada uno de los extremos C terminal y N terminal de la HSA. Dichas construcciones de HSA se divulgan en la patente estadounidense N.°5.876.969, que se incorpora al presente por referencia. Otras fusiones se pueden crear mediante la fusión de relaxina con a) la porción Fc de una inmunoglobulina; b) un análogo de la porción Fc de una inmunoglobulina; y c) fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina.

Diversas referencias divulgan la modificación de polipéptidos mediante la conjugación o glicosilación de polímeros. El término "polipéptido de relaxina" incluye polipéptidos conjugados a un polímero, por ejemplo PEG y puede comprender una o más derivaciones adicionales de cisteína, lisina u otros residuos. Además, el polipéptido de

relaxina puede comprender un ligador o polímero, donde el aminoácido al que se conjuga el ligador o polímero puede ser un aminoácido no natural de acuerdo con la presente invención, o se puede conjugar a un aminoácido codificado natural utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo el acoplamiento a lisina o cisteína.

El término "polipéptido de relaxina" también incluye relaxina glicosilada, por ejemplo, entre otros, polipéptidos glicosilados en cualquier posición de los aminoácidos, formas glicosiladas del polipéptido unidas a N o unidas a O. Las variantes que contienen cambios de nucleótido único también se consideran como variantes del polipéptido de relaxina activas desde el punto de vista biológico. Además, también se incluyen variantes de corte. El término "polipéptido de relaxina" también incluye heterodímeros, homodímeros, heteromultímeros u homomultímeros del polipéptido de relaxina de uno o más de los polipéptidos de relaxina o cualquier otro polipéptido, proteína, carbohidrato, polímero, molécula pequeña, ligador, ligando u otra molécula activa desde el punto de vista biológico de cualquier tipo, unida mediante medios químicos o expresada como una proteína de fusión, así como análogos de polipéptido, por ejemplo, eliminaciones u otras modificaciones específicas que siguen manteniendo la actividad biológica.

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

En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que modula la actividad biológica del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que

modula la actividad antiviral del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden además una adición, sustitución o eliminación que mejora la actividad antiviral del polipéptido de relaxina. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular una o más propiedades o actividades de la relaxina. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden modular la afinidad por el receptor de relaxina, modular la vida media circulante, modular la vida media terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión por proteasas, modular la dosis, modular la liberación o la biodisponibilidad, facilitar la purificación o mejorar o alterar una vía de administración particular. De igual modo, los polipéptidos de relaxina pueden comprender secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión al anticuerpo (incluso, entre otros, FLAG o poly-His) u otras secuencias basadas en la afinidad (incluso, entre otros, FLAG, poly-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluso, entre otros, biotina) que mejoran la detección (incluso, entre otros, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

El término “polipéptido de relaxina” también comprende homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que están unidos, incluso, entre otros, los unidos directamente mediante cadenas laterales de aminoácidos

codificados no naturales, ya sea a la misma cadena o diferente cadena lateral de aminoácidos codificados no naturales, a las cadenas laterales de aminoácidos codificados naturales o indirectamente mediante un ligador. Ligadores ejemplares que incluyen, entre otros, pequeños compuestos orgánicos, polímeros solubles en agua de diversas longitudes como poli(etilenglicol) o polidextrano, o polipéptidos de diversas longitudes.

Un "aminoácido codificado no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otro término que se puede utilizar como sinónimo del término "aminoácido codificado no natural" es "aminoácido no natural" y sus versiones diversas con guión y sin guión. El término "aminoácido codificado no natural" también incluye, entre otros, los aminoácidos que se producen mediante la modificación (p. ej. modificaciones postraduccionales) de un aminoácido codificado natural (incluso, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero que no están naturalmente incorporados en una cadena de polipéptidos creciente por el complejo de traducción. Ejemplos de dichos aminoácidos no naturales incluyen, entre otros, N-acetilglucosaminil-L-serina, N-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

Un "grupo de modificación del extremo amino terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al extremo

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

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

El término "enlace" o "ligador" se utiliza aquí para hacer referencia a los grupos o enlaces que normalmente se forman como el resultado de una reacción química y típicamente son enlaces covalentes. Enlaces hidrolíticamente estables significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua en valores de pH útiles, incluso, entre otros, en condiciones fisiológicas durante un período de tiempo prolongado, incluso durante un

tiempo indefinido. Enlaces degradables o hidrolíticamente inestables significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluso, por ejemplo, sangre. Enlaces degradables o enzimáticamente inestables significa que el enlace se puede degradar por una o más enzimas. Tal como se entiende en la técnica, PEG y los polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en la estructura polimérica o en el grupo ligador entre la estructura polimérica y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero. Por ejemplo, los enlaces éster formados mediante la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con los grupos alcohol en un agente activo desde el punto de vista biológico generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces degradables hidrolíticamente incluyen, entre otros, enlaces carbonatos; enlaces imina que resultan de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces de éster de fosfato formados por la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son el producto de la reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de la reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de la reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amino, incluso, entre otros, en un extremo de un polímero como PEG, y un

grupo carboxilo de un péptido; y enlaces de oligonucleótidos formados por un grupo fosforamidita, incluso, entre otros en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

El término "molécula activa desde el punto de vista biológico", "fracciones activas desde el punto de vista biológico" o "agente activo desde el punto de vista biológico" cuando se utiliza aquí significa cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción referente a un organismo, incluso, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposón, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, según se utiliza aquí, las moléculas activas desde el punto de vista biológico incluyen, entre otros, cualquier sustancia destinada para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad en seres humanos u otros animales, o para mejorar por otra parte el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales. Ejemplos de moléculas activas desde el punto de vista biológico incluyen, entre otros, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, vacunas, inmunógenos, fármacos duros, fármacos blandos, carbohidratos, átomos o moléculas inorgánicos, tinturas, lípidos, nucleósidos, radionucleidos, oligonucleótido, toxoides, toxinas, células procariotas y

eucariotas, virus, polisacáridos, ácidos nucleicos y porciones de este obtenidos o derivados de virus, bacterias, insectos, animales o cualquier otra célula o tipo de célula, liposomas, micropartículas y micelas. Los polipéptidos de relaxina se pueden añadir en una formulación micelar; véase patente estadounidense N.°5.833.948, que se incorpora al presente por referencia en su totalidad. Clases de agentes activos desde el punto de vista biológico que son adecuados para el uso con la invención incluyen, entre otros, fármacos, profármacos, radionucleidos, agentes de imágenes, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes anti-tumorales, agentes cardiovasculares, agentes ansiolíticos, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroides, toxinas derivadas de microbios y similares.

Un "polímero bifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales discretos que pueden reaccionar específicamente con otras fracciones (incluso, entre otros, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un ligador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en un componente activo desde el punto de vista biológico particular y otro grupo reactivo con un grupo en un segundo componente biológico, se puede utilizar para formar un conjugado que incluye el primer componente activo desde el

punto de vista biológico, el ligador bifuncional y el segundo componente activo desde el punto de vista biológico. Se conocen muchos procedimientos y moléculas ligadoras para la unión de varios compuestos a los péptidos. Véase, p. ej., solicitud de patente europea N.°188.256; patentes estadounidense N.°4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789 que se incorporan al presente por referencia. Un "polímero multifuncional" se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales discretos que pueden reaccionar específicamente con otras fracciones (incluso, entre otros, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o polímero multifuncional puede ser de cualquier longitud o peso molecular deseado y se puede seleccionar para proporcionar una distancia o conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas a la relaxina y su receptor o relaxina.

Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, igualmente comprenden los sustituyentes químicos idénticos que derivarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura CH20 es equivalente a la estructura -OCH2.

El término "sustituyentes" incluye, entre otros, "sustituyentes que no interfieren". Los "sustituyentes que no

interfieren" son los grupos que producen compuestos estables. Radicales o sustituyentes que no interfieren adecuados incluyen, entre otros, halo, alquilo C1-C10, alquenilo C2-C10, alquinilo C2-C10, alcoxilo C1-C10, araquilo C1-C12, alcarilo C1-C12, cicloalquilo C3-C12, cicloalquenilo C3-C12, fenil, fenil sustituido, toluoil, xilenil, bifenil, alcoxialquilo C2-C12, alcoxiarilo C2-C12, ariloxialquilo C7-C12, oxiarilo C7-C12, alquilsulfonilo C1-C6, alquilsulfonilo C1-C10, --(CH2)m --O--(alquilo C1-C10) en donde m de 1 a 8, aril, aril sustituido, alcoxil sustituido, fluoroalquil, radicales heterocíclicos, radicales heterocíclicos sustituidos, nitroalquil, --N02, --CN, --NRC(O)—(alquilo C1-C10), --C(O)- -(alquilo C1-C10), alquilo tioalquilo C2-C10, --C(O)O--(alquilo C1-C10), --OH, --SO2, =S, --COOH, --NR2, carbonilo, --C(O)--(alquilo C1-C10)-CF3, --C(O)—CF3, --C(O)NR2, --(arilo C1-C10)-S--(arilo C6-C10), --C(O)--(arilo C1-C10), --(CH2)m --O--(alquilo--(CH2)m—O—C1-C10) en donde cada m es de 1 a 8, --C(O)NR2, --C(S)NR2, --SO2NR2, --NRC(O)NR2, --NRC(S)NR2, sus sales y similares. Cada R, según se utiliza aquí, es H, alquil o alquil sustituido, aril o aril sustituido, aralquil o alcaril.

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

El término "alquilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario,

una cadena lineal o ramificada, un radical hidrocarbonado cíclico o una combinación de estos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturados y puede incluir radicales di y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C1-C10 significa de uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, entre otros, grupos como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros, por ejemplo, de n-pentil, n-hexil, n-heptil, n-octil y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más doble enlaces o triple enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, entre otros, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3- (1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El término “alquilo”, excepto que se indique lo contrario, también se entiende que incluye los derivados de alquilo definidos más detalladamente a continuación, por ejemplo “heteroalquilo”. Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarbonados se demominan “homoalquilo”.

El término “alquileno”, por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alcano, según se muestra, entre otros, en las estructuras

-CH2CH2- y –CH2CH2CH2CH2- y además incluye los grupos descritos a continuación como “heteroalquileno”. Típicamente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá entre 1 y 24 átomos de carbono y los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono son una realización particular de los métodos y composiciones descritos aquí. Un “alquilo inferior” o “alquileno inferior” es un grupo alquileno o alquilo de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

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

El término “heteroalquilo”, por sí solo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, un radical hidrocarbonado cíclico o una combinación de estos, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grup que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar, opcionalmente, oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar, opcionalmente, cuaternizado. Los heteroátomos O, N, S y Si pueden estar ubicados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo está unido al resto de la molécula.

Ejemplos incluyen, entre otros, -CH2-CH2-O-CH3, -CH2-CH2- NH-CH3, -CH2-CH2-N(CH3)-CH3, -CH2-S-CH2-CH3, -CH2-CH2,-S(O)-CH3, -CH2-CH2- S(O)2-CH3, -CH=CH-O-CH3, -Si(CH3)3, -CH2-CH=N-OCH3 y -CH=CH-N(CH3)-CH3. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, por ejemplo -CH2-NH-OCH3 y -CH2-O-Si(CH3)3. De igual modo, el término "heteroalquileno", por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de heteroalquilo, según se muestra, entre otros, en -CH2-CH2-S-CH2 CH2- y -CH2-S-CH2-CH2-NH-CH2-. Para los grupos heteroalquileno, el mismo heteroátomo o diferentes heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos terminales de la cadena (incluso, entre otros, alquilenoxi, alquilendioxilo, alquilenamino, alquilendiamina, aminooxialquileno y similares). Además, para los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, ninguna orientación del grupo de enlace está implícita en la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula -C(O)2R: representa ambas -C(O)2R' y -R'C(O)2.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí solos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquil o heterocicloalquil incluyen enlaces de anillos saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Adicionalmente, para el heterocicloalquil, un

heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquil incluyen, entre otros, ciclopentil, ciclohexil, 1-ciclohexenil, 3-ciclohexenil, cicloheptil y similares. Ejemplos de heterocicloalquil incluyen, entre otros, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridil), 1-piperidinil, 2-piperidinil, 3-piperidinil, 4-morfolinil, 3-morfolinil, tetrahidrofuran-2-il, tetrahidrofuran-3-il, tetrahidrotien-2-il, tetrahidrotien-3-il, 1-piperazinil, 2-piperazinil y similares. Adicionalmente, el término comprende estructuras de anillos bicíclicos y tricíclico. De igual modo, el término "heterocicloalquileno" por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de heterocicloalquil y el término "cicloalquileno" por sí solo o como parte de otro sustituyente, significa, un radical divalente derivado de cicloalquil.

Según se emplea aquí, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en disolventes acuosos. El enlace de los polímeros solubles en agua a los polipéptidos de relaxina puede producir cambios, incluso, entre otros, vida media sérica aumentada o modulada o vida media terapéutica aumentada o modulada con respecto a la forma no modificada, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas como la agregación y formación de multímeros, unión al receptor

alterada, unión alterada a una o más parejas de unión y dimerización o multimerización del receptor alterada. El polímero soluble en agua puede tener o no tener su propia actividad biológica y se puede utilizar como un ligador para unir la relaxina a otras sustancias, incluso, entre otros, uno o más polipéptidos de relaxina o una o más moléculas activas desde el punto de vista biológico. Los polímeros adecuados incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, sus derivados mono C1-C10 alcoxi o ariloxi (descritos en la patente estadounidense N.°5.252.714 que se incorpora al presente por referencia), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliaminoácidos, divinil éter anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropil)- metacrilamida, dextrano, derivados del dextrano, incluso dextrano sulfato, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa y derivados de celulosa, incluso, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y sus derivados, copolímeros de polialquilenglicoles y sus derivados, ésteres de poliviniletil y alfa-beta-poli[(2- hidroxietil)-DL-aspartamida y similares, o sus mezclas. Ejemplos de dichos

polímeros solubles en agua incluyen, entre otros, polietilenglicol y albúmina sérica.

Según se emplea aquí, el término "polialquilenglicol" o "poli(alquenglicol)" se refiere a polietilenglicol(poli(etilenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol y sus derivados. El término "polialquilenglicol" comprende ambos polímeros, lineal y ramificado y pesos moleculares promedio de entre 0,1 kDa y 100 kDa. Se mencionan otras realizaciones ejemplares, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, por ejemplo el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado, aromático, que puede ser de anillo único o de múltiples anillos (incluso, entre otros, de 1 a 3 anillos) que se fusionan o se unen por enlace covalente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están, opcionalmente, oxidados y los átomos de nitrógeno está, opcionalmente, cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no exhaustivos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenil, 1-naftil, 2-naftil, 4-bifenil, 1-

pirrolil, 2-pirrolil, 3-pirrolil, 3-pirazolil, 2-imidazolil, 4-imidazolil, pirazinil, 2-oxazolil, 4-oxazolil, 2-fenil-4-oxazolil, 5-oxazolil, 3-isoxazolil, 4-isoxazolil, 5-isoxazolil, 2-tiazolil, 4-tiazolil, 5-tiazolil, 2-furil, 3-furil, 2-tienil, 3-tienil, 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 2-pirimidil, 4-pirimidil, 5-benzotiazolil, purinil, 2-benzimidazolil, 5-indolil, 1-isoquinolil, 5-isoquinolil, 2-quinoxalinil, 5-quinoxalinil, 3-quinolil y 6-quinolil. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

Para abreviar, el término "arilo" cuando se utiliza en combinación con otros términos (incluso, entre otros, ariloxi, ariltioxi, arilalcil) incluye ambos anillos, aril y heteroaril como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" implica incluir los radicales en los cuales un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluso, entre otros, bencil, fenetil, piridilmetil y similares) que incluyen los grupos alquilo en los cuales un átomo de carbono (incluso, entre otros, un grupo metileno) se ha reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (incluso, entre otros, fenoximetil, 2-piridiloximetil, 3-(1-naftiloxi)propil y similares).

Cada uno de los término anteriores (incluso, entre otros, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo")

implican incluir ambas formas, sustituidas y no sustituidas del radical indicado. A continuación se proporcionan sustituyentes ejemplares para cada tupo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquil y heteroalquil (incluso los grupos que suelen denominarse alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenil, alquinil, cicloalquil, heterocicloalcil, cicloalquenil, y heterocicloalquenil) pueden ser uno o más de varios grupos seleccionados de, entre otros: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR'C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R' -NR-C(NR'R"R'")=NR"", NR C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN y —NO2 en un número que oscila entre cero y (2m',+1), en donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R", R"' y R"" cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquil sustituido y no sustituido, aril sustituido y no sustituido, incluso, entre otros, aril sustituido por halógenos 1-3, alquil sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R' R", R'" y R"" cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de

nitrógeno para formar un anillo de 5-, 6-, o 7-miembros. Por ejemplo, -NR'R" implica incluir, entre otros, 1-pirrolidinil y 4-morfolinil. Del análisis de sustituyentes anterior, el entendido en la técnica entenderá que el término "alquilo" implica incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquil (incluso, entre otros, -CF3 y -CH2CF3) y acil (incluso, entre otros, -C(O)CH3, -C(O)CF3, -C(O)CH2OCH3 y similares).

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

grupos R’ R”, R’” y R”” cuando más de uno de estos grupos está presente.

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

El término “vida media terapéutica aumentada”, según se emplea aquí, significa el cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de relaxina, con respecto a su forma no modificada. La vida media terapéutica se mide midiendo las propiedades de farmacocinéticas o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos de tiempo después de la administración. La vida media terapéutica aumentada preferentemente permite un

régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total particular beneficiosa o evita un efecto no deseado. En algunas realizaciones, la vida media terapéutica aumentada resulta de la potencia aumentada, o de la unión aumentada o disminuida de la molécula modificada a su diana, ruptura aumentada o disminuida de la molécula por las enzimas como proteasas, o un aumento o disminución en otros parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada o un aumento o disminución en la eliminación de la molécula mediada por el receptor.

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína está libre de al menos algunos de los componentes celulares con los cuales está asociado en el estado natural, o que el ácido nucleico o la proteína se ha concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción in vivo o in vitro. Puede estar en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semi-seco, o en solución, incluso, entre otros, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se determinan, típicamente, utilizando técnicas químicas analíticas como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía por tamaño de alto rendimiento. Una proteína

que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa a partir de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína diferente del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína producen sustancialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, puede implicar que el ácido nucleico o proteína tenga al menos el 85 % de pureza, al menos el 90 % de pureza, al menos el 95 % de pureza, al menos el 99 % o más de pureza.

El término "ácido nucleico" se refiere a desoxiribonucleótidos, desoxiribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y sus polímeros, ya sea en forma de cadena única o cadena doble. A menos que se lo excluya específicamente, el término comprende los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de un modo similar al de los nucleótidos naturales. A menos que se limite específicamente de otra manera, el término también se refiere a análogos del oligonucleótido, incluso PNA (ácido nucleico peptídico), análogos de ADN utilizando en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos específica también abarca implícitamente variantes

modificadas de forma conservadora (incluso, entre otros, sustituciones del código degenerado) y secuencias complementarias así como también la secuencia explícitamente indicada. En particular, las sustituciones del código degenerado pueden lograrse al generar secuencias en las que la tercera posición de uno o más códigos se sustituye con una base mezclada y/o residuos de desoxiinosina (Batzer y colaboradores, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma alternativa para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una y viceversa. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos naturales así como polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido codificado no natural. Según se los emplea aquí, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier extensión, incluyendo las proteínas de longitud completa, donde los residuos de aminoácidos se unen a partir de enlaces covalentes de péptidos.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a

los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturales son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofan, tirosina y valina) y pirrolisina y selenocisteína. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. La referencia a un aminoácido incluye, por ejemplo, aminoácidos L proteogénicos naturales; aminoácidos D, aminoácidos modificados químicamente como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos naturales como β-alanina, ornitina, etc.; y compuestos sinterizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de los aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, entre otros, α-metil aminoácidos (p. ej., α-metilalanina), aminoácidos D, aminoácidos como histidina (p. ej., 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-

histidina y α-metil-histidina), aminoácidos que tienen un metileno extra en la cadena lateral ("homo" aminoácidos) y aminoácidos en los cuales un grupo funcional ácido carboxílico en la cadena lateral se reemplaza por un grupo de ácido sulfónico (p. ej., ácido de cisteína). La incorporación de aminoácidos no naturales, incluso aminoácidos no naturales sintéticos, aminoácidos sustituidos, o uno o más aminoácidos D en las proteínas de la presente invención puede ser beneficiosa de varias maneras diferentes. Los péptidos que contienen aminoácidos D, etc., presentan estabilidad aumentada in vitro o in vivo con comparación con las contrapartes que contienen aminoácidos L. Por lo tanto, la construcción de péptidos, etc., que incorpora aminoácidos D puede ser particularmente útil cuando se desea o requiere mayor estabilidad intracelular. Más específicamente, los péptidos D, etc., son resistentes a las proteasas y peptidasas endógenas, proporcionando así biodisponibilidad mejorada de la molécula y vidas útiles prolongadas in vivo cuando dichas propiedades son deseables. Adicionalmente, los péptidos D, etc., no se pueden procesar de manera eficaz para una representación restringida por la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad a las células T auxiliares y, por lo tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en todo el organismo.

Los aminoácidos se pueden denominar aquí por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Los nucleótidos, también, se pueden denominar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Variantes modificadas de forma conservadora" se aplica a las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos específicas, "variantes modificadas de forma conservadora" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degradación del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican la alanina de aminoácidos. Por lo tanto, en cada posición en donde una alanina se especifica por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe

cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. El entendido en la técnica reconocerá que cada codón es un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para la metionina, y TGG, que es comúnmente el único codón para triptofan) se pueden modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Como para las secuencias de aminoácidos, en entendido en la técnica reconocerá que las sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" en donde la alteración produce la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas para los entendidos en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservadora son en adición y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

Las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son

conocidas para los entendidos en la técnica. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);
2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
4) Arginina (R), Lisina (K);
5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofan (W);
7) Serina (S), Treonina (T); y
8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, p. ej., Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993).

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" si tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, aproximadamente el 60 % de identidad, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 95 % de

identidad sobre una región específica), cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada según lo medido utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para las personas entendidas en la técnica) o mediante la alineación manual y la inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. La identidad puede existir sobre una región que es al menos aproximadamente de 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o sobre una región que es de 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o, en donde no se especifica, a lo largo de toda la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluso homólogos de otra especie que no sea la humana, se puede obtener a través de un proceso que comprende las etapas de selección de una genoteca en condiciones estrictas de hibridación con una sonda marcada que tiene una secuencia de polinucleótido de la invención o un fragmento de la misma, y aislando ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos. Dichas técnicas de hibridación se conocen por los entendidos en la técnica.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, para la cual las secuencias de prueba se compran. Cuando se utiliza

un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y prueba se ingresan a un ordenador, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si fuera necesario, y los parámetros del programa de algoritmos de secuencia se designan. Se pueden utilizar los parámetros predeterminados del programa o, alternativamente, se pueden designar los parámetros. El algoritmo de comparación de secuencias luego calcula el porcentaje de identidades de las secuencias para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", según se emplea aquí, incluye una referencia a un segmento de cualquiera de la cantidad de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de entre 20 y 600, usualmente aproximadamente 50 y aproximadamente 200, más usualmente aproximadamente 100 y aproximadamente 150 en donde una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de que dos secuencias se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son conocidos para los entendidos en la técnica. Se puede realizar una alineación óptima de secuencias para la comparación, incluso, entre otros, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl, Math.2:482c, mediante el algoritmo de

alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda de un método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA 85:2444, mediante la implementación de estos algoritmos computerizada (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante la alineación manual y la inspección visual (véase, p. ej., Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 1995)).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de las secuencias y la similitud de las secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2,0, que se describen en Altschul y col. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, y Altschul y col. (1990) J, Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del Centro nacional para la información biotecnológica disponible en la red mundial ncbi.nlm.nih.gov. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencia de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y la

matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA+ 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST típicamente se realiza con el filtro de "baja complejidad" apagado.

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

La frase "selectivamente (o específicamente) se hibridiza a" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula solamente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones estrictas de hibridación cuando la secuencia está presente en una mezcla de complejo (incluso, entre otros, total celular o genoteca ADN o ARN).

La frase "condiciones estrictas de hibridación" se refiere a hibridización de las secuencias de ADN, ARN, PNA u otras imitaciones de ácidos nucleicos, o combinaciones de las mismas en condiciones de fuerza iónica baja y alta temperatura como se conoce en la técnica. Típicamente, en condiciones estrictas un sonda se hibridizará a su subsecuencia diana en una mezcla de complejo de ácido nucleico (incluso, entre otros, total celular o genoteca ADN o ARN) pero no se hibridiza a otras secuencias en la mezcla de complejo. Las condiciones estrictas son dependientes de las secuencias y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridizan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa pra la hibridación de los ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology— Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan para ser aproximadamente 5-10 °C menor que el punto de fusión térmica (Tm) para la secuencia específica en un pH de fuerza iónica definido. El Tm es la temperatura (en fuerza iónica definida, pH y concentración nucleica) en la cual el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridizan a la secuencia diana en equilibrio (mientras las secuencias diana estén presentes in exceso, en Tm, el 50 % de

las sondas se pueden ocupar en equilibrio). Las condiciones estrictas pueden ser en las cuales la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ión de sodio, típicamente aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión de sodio (u otras sales) en pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (incluso, entre otros, de 10 a 50 nucleótidos) y en al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (incluso, entre otros, más que 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos dos veces de fondo, opcionalmente 10 veces hibridación de fondo. Las condiciones estrictas de hibridación ejemplares pueden ser de la siguiente manera: 50 % de formamida, 5X SSC, y 1 % SDS, incubación a 42 °C, o 5X SSC, 1 % SDS, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2X SSC, y 0,1% SDS a 65 °C. Dichos lavados se pueden realizar durante 5, 15, 30, 60, 120 o más minutos.

Según se emplea aquí, el término “eucariota” se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya como animales (incluso, entre otros, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluso, entre otros, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios, protistas, etc.

Según se emplea aquí, el término “no eucariota” se refiere a organismos no eucariotas. Pro ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético Eubacteria (incluso, entre otros, Escherichia coli, Thermus thermophilus, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, etc.), o el dominio filogenético Archaea (incluso, entre otros, Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium como especies Haloferax volcanii y Halobacterium NRC-1, Archaeoglobus fulgidus, Pyrococcus furiosus, Pyrococcus horikoshii, Aeuropyrum pernix, etc.).

El término “sujeto” según se utiliza aquí, se refiere a un animal, en algunas realizaciones un mamífero, y en otras realizaciones un ser humano, que es el objeto del tratamiento, observación o experimento. Un animal puede ser un animal de compañía (p. ej., perros, gatos y similares), animal de granja (p. ej., vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (p. ej., ratas, ratones, cobayos y similares).

El término “cantidad eficaz”, según se emplea aquí, se refiere a la cantidad de polipéptido de aminoácidos no naturales modificados que se está administrando que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. Las composiciones

que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificados descrito aquí se pueden administrar para tratamientos profiláctico, de mejora o terapéutico.

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

El término "modificado", según se emplea aquí, se refiere a cualquier cambio hecho a un polipéptido determinado, por ejemplo cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación cotraduccional o la modificación postraduccional de un polipéptido. El término con forma "(modificado)" significa que los polipéptidos establecidos

están, opcionalmente, modificados, es decir, los polipéptidos en discusión se pueden modificar o no modificar.

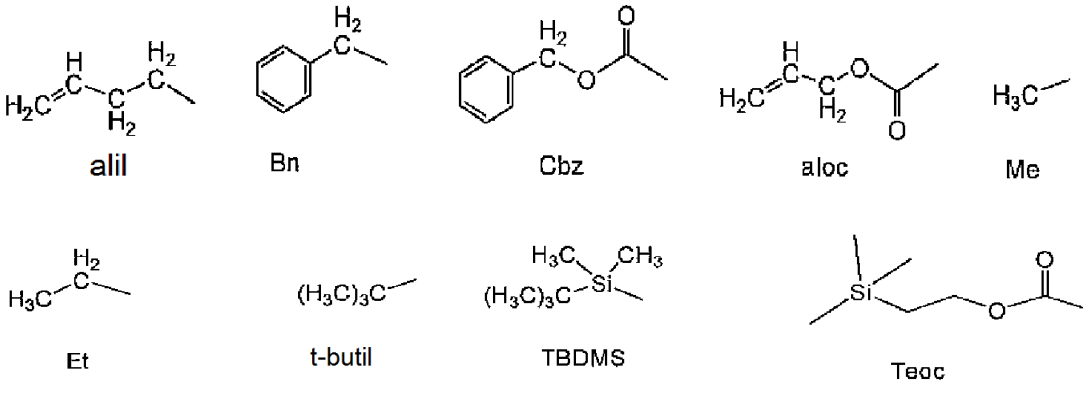
El término "modificado postraduccionalmente" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se le realiza a dicho aminoácido después de ser incorporado en una cadena de polipéptidos. El término abarca, solamente a modo de ejemplo, las modificaciones cotraduccionales in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

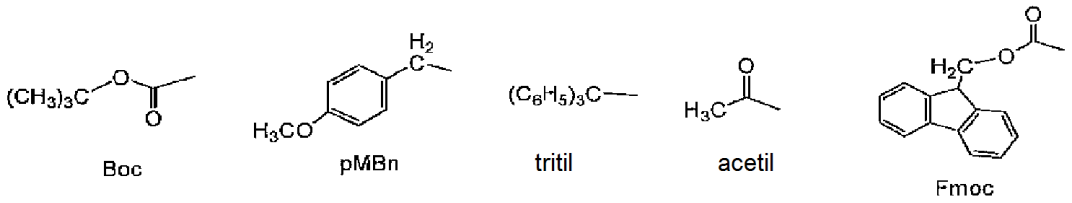
En aplicaciones profilácticas, las composiciones que tienen el polipéptido de relaxina se administran a un paciente susceptible o que de otro modo corre riesgo de una enfermedad, trastorno o afección particular. Se define que dicha cantidad es una "cantidad profilácticamente eficaz". En este uso, las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

El término "protegido" se refiere a la presencia de un "grupo protector" o fracción que evita la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en ciertas condiciones de

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

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





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

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que contienen el polipéptido de aminoácidos no naturales modificados se administran a un paciente que ya sufre una enfermedad, afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Se define que dicha cantidad es una "cantidad terapéuticamente eficaz" y dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad, trastorno o afección, de la terapia anterior, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Se considera bien para el entendido en la técnica determinar dichas cantidades terapéuticamente eficaces mediante la experimentación de rutina (p. ej., un ensayo clínico de dosificación en escalas).

Los polipéptidos de relaxina de la presente invención se pueden utilizar para modular la vasoconstricción, la NO producción, ET-1, Ang II, y la agregación plaquetaria. En una realización de la presente invención, un paciente que

necesita la recibe una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuiría la vasoconstricción del paciente sobre el valor de referencia de su tratamiento deseado por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200%. En una realización de la presente invención hay un método de tratamiento de un paciente que lo necesita para aumentar la producción de NO del paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido de relaxina para aumentar la producción de NO por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %.

En una realización de la presente invención hay un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuye la agregación plaquetaria del paciente por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200%. En otra realización de la presente invención hay un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina para

disminuir la hipertrofia. En otra realización de la presente invención hay un método de tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad terapéutica de polipéptidos de relaxina de la presente invención que disminuye la síntesis de proteínas estimulada por CF por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200%. En una realización de la presente invención hay un método de tratamiento de un paciente que lo necesita para aumentar la expresión de ANP del paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido de relaxina para aumentar la producción de NO por el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, más del 100 %, 150 %, más del 150 %, 200 %, más del 200 %.

Los presente métodos en los cuales una peg-relaxina de la presente invención tiene un aumento de 10 veces en AUC en comparación con un aumento de 15 veces de relaxina natural; aumento de más de 15 veces; aumento de 20 veces; aumento de más de 20 veces; aumento de 25 veces; aumento de más de 25 veces; aumento de 30 veces; aumento de más de 30 veces; aumento de 35 veces; aumento de más de 35 veces; aumento de 40 veces; aumento de más de 40 veces; aumento de 45 veces; aumento de más de 45 veces; aumento de 50 veces; aumento de

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

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

Los polipéptidos de aminoácido codificado no natural presentados aquí pueden incluir compuestos marcados isotópicamente con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa usualmente encontrado en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógenos, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, por ejemplo 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 35S, 18F, 36Cl, respectivamente. Determinados compuestos marcados isotópicamente descritos aquí, por ejemplo en los cuales se incorporan los isótopos radioactivos como 3H y 14C, pueden ser útiles en los ensayos de distribución de tejidos del sustrato o fármaco. Además, la sustitución por isótopos como deuterio, es decir, 2H, puede

proporcionar determinadas ventajas terapéuticas a causa de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media in vivo aumentada o requisitos de dosificación reducidos.

Todos los isómeros, incluso, entre otros, diastereómeros, enantiómeros, y sus mezclas se consideran como parte de las composiciones descritas aquí. En realizaciones adicionales u otras realizaciones, los polipéptidos de aminoácido codificado no natural se metabolizan tras la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se utiliza para producir un efecto deseado, incluso un efecto terapéutico deseado. En realizaciones adicionales u otras realizaciones hay metabolitos activos de polipéptidos de aminoácido codificado no natural.

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

En la invención se proporcionan polipéptidos de relaxina que comprenden al menos un aminoácido no natural. En determinadas realizaciones de la invención, el polipéptido de relaxina con al menos un aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraduccional. En una realización, la o las modificaciones postraduccionales comprenden una unión de una molécula, incluso, entre otros, un marcador, un tinte, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotoentrecruzador, un radionucleido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metal, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, ácido ribonucleico

inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radioactiva, un nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa por enlace covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotoliberadora, una fracción excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente de reducción activo, un aminotioácido, una fracción tóxica, un grupo etiquetado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente activo desde el punto de vista biológico, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable, que comprende un segundo grupo reactivo con al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo, utilizando metodología química, conocida para el entendido en la técnica, adecuada para los grupos reactivos particulares. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es una

fracción alquinil (incluso, entre otros, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina, en donde el grupo propargilo también se denomina a veces como fracción acetileno) y el segundo grupo reactivo es una fracción azido y se utilizan las metodologías químicas de cicloadición [3+2]. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es la fracción azido (incluso, entre otros, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquinil. En determinadas realizaciones del polipéptido de relaxina modificado de la presente invención, se utiliza al menos un aminoácido no natural (incluso, entre otros, aminoácido no natural que contiene un grupo funcional ceto) que comprende al menos una modificación postraduccional, en donde la o las modificaciones postraduccionales comprenden una fracción sacárida. En determinadas realizaciones, la modificación postraduccional se realiza in vivo en una célula eucariota o en una célula no eucariota. Un ligador, polímero, polímero soluble en agua u otra molécula pueden unir la molécula al polipéptido. La molécula puede estar unida directamente al polipéptido.

En determinadas realizaciones, la proteína incluye al menos una modificación postraduccional que se realiza in vivo por una célula huésped, en donde la modificación postraduccional no se realiza normalmente por otro tipo de célula huésped. En determinadas realizaciones, la proteína

incluye al menos una modificación postraduccional que se realiza in vivo por una célula eucariota, en donde la modificación postraduccional no se realiza normalmente por una célula no eucariota. Ejemplos de modificaciones postraduccionales incluyen, entre otros, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de unión de glicolípidos y similares.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados no naturales para la glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de unión de glicolípidos del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados no naturales para la glicosilación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados naturales para la glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación o modificación de unión de glicolípidos del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende uno o más aminoácidos codificados naturales para la glicosilación del polipéptido.

En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos

codificados no naturales que mejoran la glicosilación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más eliminaciones que mejoran la glicosilación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados no naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más eliminaciones que mejoran la glicosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados no naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido codificado no natural en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados no naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido codificado natural en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido diferente en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados no naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido codificado natural

en el polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido de relaxina comprende una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos codificados no naturales que mejoran la glicosilación en un aminoácido codificado no natural en el polipéptido.

En una realización, la modificación postraduccional comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (incluso, entre otros, en donde el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)2-Man-GlcNAc-GlcNAc y similares). En otra realización, la modificación postraduccional comprende la unión de un oligosacárido (incluso, entre otros, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por un enlace GalNAc-serina, un enlace GalNAc-treonina, un enlace GlcNAc-serina o un enlace GlcNAc-treonina. En determinadas realización, una proteína p polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítopos, una etiqueta FLAG, una etiqueta polihistidina, una fusión GST y similares. Ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, entre otros, una secuencia señal de secreción procariota, una secuencia señal de secreción eucariota, una secuencia señal de secreción eucariota optimizada en 5’ para expresión bacteriana, una secuencia señal de secreción nueva, una secuencia señal de secreción de pectato liasa, secuencia señal de secreción de Omp A y una secuencia señal de

secreción de fago. Ejemplos de secuencias señal de secreción incluyen, entre otros, STII (procariota), Fd GIII y M13(fago), Bg12 (levadura) y la secuencia señal bla derivada de un transposón. Cualquiera de estas secuencias se puede modificar para proporcionar un resultado deseado con el polipéptido, incluso, entre otros, sustituyendo una secuencia señal por una secuencia señal diferente, sustituyendo una secuencia líder por una secuencia líder diferente, etc.

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

La presente invención proporciona métodos y composiciones en base a la relaxina que comprenden al menos un aminoácido codificado no natural. La introducción de al menos un aminoácido codificado no natural en la relaxina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que

comprenden reacciones químicas específicas, incluso, entre otros, con uno o más aminoácidos codificados no naturales cuando no reacciona con los 20 aminoácidos habituales. En algunas realizaciones, la relaxina que comprende los aminoácidos codificados no naturales está unida a un polímero soluble en agua, por ejemplo polietilenglicol (PEG), mediante la cadena lateral del aminoácido codificado no natural. La invención proporciona un método de alta eficacia para la modificación selectiva de proteínas con derivados de PEG, que comprende la incorporación selectiva de aminoácidos no codificados genéticamente, incluso, entre otros, los aminoácidos que contienen grupos funcionales o sustituyentes que no se encuentran en los 20 aminoácidos que se incorporan naturalmente, incluso, entre otros, una cetona, una porción azida o acetileno, en proteínas en respuesta a un codón selector y la posterior modificación de esos aminoácidos con un derivado de PEG adecuadamente reactivo. Una vez incorporadas, las cadenas laterales de aminoácidos luego se pueden modificar utilizando metodologías químicas conocidas por los entendidos en la técnica como adecuadas para los grupos funcionales particulares o sustituyentes presentes en el aminoácido codificado no natural. Las metodologías químicas conocidas de una amplia gama son adecuadas par el uso en la presente invención para incorporar un polímero soluble en agua en la proteína. Dichas metodologías incluyen,

entre otros, una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, p. ej., Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y Huisgen, R. en 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) con, incluso entre otros, derivados de acetileno o azida, respectivamente.

Debido a que el método de cicloadición de Huisgen [3+2] implica una cicloadición en lugar de una reacción de sustitución nucleofílica, las proteínas se pueden modificar con selectividad extremadamente alta. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad (1.4 > 1.5) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, p. ej., Tornoe, y col., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; y Rostovtsev, y col., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; y WO 03/101972. Una molécula que se puede añadir a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un grupo funcional adecuado o sustituyente, incluso, entre otros, un derivado de azido o acetileno. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo acetileno, incluso, entre otros, p-propargiloxifenilalanina o grupo azido, incluso, entre otros, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

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

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

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

La presente invención proporciona conjugados de sustancias que tienen una amplia diversidad de grupos funcionales, sustituyentes o fracciones, con otras sustancias, incluso, entre otros, un marcador, un tinte, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotoentrecruzador, un radionucleido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metal, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radioactiva, un

nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa por enlace covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotoliberadora, una fracción excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente de reducción activo, un aminotioácido, una fracción tóxica, un grupo etiquetado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente activo desde el punto de vista biológico, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. La presente invención también incluye conjugados de sustancias que tienen fracciones azida o acetileno con derivados del polímero PEG que tienen las fracciones acetileno o azida correspondientes. Por ejemplo, un polímero PEG que contienen una fracción azida se pueden acoplar a una molécula activa desde el punto de vista biológico en una posición en la proteína que contiene un aminoácido no codificado genéticamente que tiene una

funcionalidad de acetileno. El enlace por el cual el PEG y la molécula activa desde el punto de vista biológico están acoplados incluye, entre otros, el producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

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

La invención incluye un método para sintetizar los polímeros de la invención que contienen azida y acetileno. En el caso del derivado de PEG que contiene azida, la azida puede estar enlazada directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene

azida se puede preparar mediante la unión de un agente de enlace que tiene una fracción azida en un extremo terminal a un polímero convencional activado de modo que el polímero resultante tienen la fracción azida en su extremo terminal. En el caso del derivado de PEG que contiene acetileno, el acetileno puede estar enlazado directamente a un átomo de carbono del polímero. Alternativamente, el derivado de PEG que contiene acetileno se puede preparar mediante la unión de un agente de enlace que tiene una fracción acetileno en un extremo terminal a un polímero convencional activado de modo que el polímero resultante tienen la fracción acetileno en su extremo terminal.

Más específicamente, en el caso del derivado de PEG que contiene azida, un polímero soluble en agua que tiene al menos una fracción hidroxilo activa experimenta una reacción para producir un polímero sustituido que tienen una fracción más reactiva, por ejemplo un mesilato, tresilato, tosilato o grupo saliente de halógeno, en el mismo. Los entendidos en la técnica conocen la preparación y el uso de derivados de PEG que contienen haluros de ácidos sulfonil, átomos de halógeno y otros grupos salientes. El polímero sustituido resultante luego experimenta una reacción para sustituir la fracción más reactiva por una fracción azida en el extremo terminal del polímero. Alternativamente, un polímero soluble en agua que tiene al menos una fracción activa nucleofílica o

electrofílica experimenta una reacción con un agente de enlace que tiene una azida en un extremo terminal para que se forme un enlace covalente entre el polímero PEG y el agente de enlace y la fracción azida se ubica en el extremo terminal del polímero. Los entendidos en la técnica conocen las fracciones nucleofílica y electrofílica, incluso aminas, tioles, hidrazidas, hidrazinas, alcoholes, carboxilatos, aldehídos, cetonas, tioésteres y similares.

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

La invención también proporciona un método para la modificación selectiva de proteínas para añadir otras sustancias a la proteína modificada, incluso, entre otros, polímeros solubles en agua como PEG y derivados de PEG que contienen una fracción azida o acetileno. Se pueden utilizar derivados de PEG que contienen azida y acetileno para modificar las propiedades de las superficies y moléculas en donde la biocompatibilidad, la estabilidad, la solubilidad y la falta de inmunogenicidad son importantes, proporcionando al mismo tiempo un medio más selectivo de unión de los derivados de PEG a las proteínas del que se conocía previamente en la técnica.

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

En numerosas realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de relaxina de interés se aislarán, se clonarán y con frecuencia se alterarán utilizando métodos recombinantes. Dichas realizaciones se utilizan, incluso, entre otros, para la expresión de la proteína o durante la generación de variantes, derivados, casetes de expresión u otras secuencias derivadas de un polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, las secuencias que codifican los polipéptidos de la invención están unidas funcionalmente a un promotor heterólogo.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural se puede sinterizar basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido original, incluso, entre otros, con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID N.°: 1 y SEQ ID N.°: 2 y luego cambiando la secuencia de nucleótidos para efectuar la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o eliminación (es decir, eliminación o sustitución) de los residuos de aminoácidos relevantes. La secuencia de nucleótidos se puede modificar de forma conveniente a través de mutagénesis de sitio dirigido de acuerdo con los métodos convencionales. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se puede preparar a través de síntesis química, incluso, entre otros, utilizando un sinterizador oligonucleótido, en donde los oligonucleótidos se diseñan en base a la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y, preferentemente, seleccionando los codones que son favorecidos en la célula huésped en la cual se producirá el polipéptido recombinante.

La presente invención utiliza técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que divulgan los métodos de uso generales en la presente invención incluyen Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and

Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., eds., 1994)).

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

Varios tipos de mutagénesis se utilizan en la invención para diversos fines, incluso, entre otros, para producir sintetasas nuevas o ARNt, para mutar moléculas de LRNA, para mutar polinucleótidos que codifican sintetasas, para producir genotecas de ARNt, para producir genotecas de sintetasas, para producir codones selectores, para insertar codones

selectores que codifican aminoácidos no naturales en una proteína o polipéptido de interés. Incluyen, entre otros, mutagénesis de sitio dirigido, de punto aleatorio, recombinación homóloga, reordenamiento de ADN u otros métodos de mutagénesis recurrente, construcción quimérica, mutagénesis que utiliza uracilo que contiene plantillas, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de ADN modificada por fosforotioato, mutagénesis que utiliza ADN doble con huecos o similares, mutagénesis mediada por PCT, o cualquier combinación de estos. Métodos adecuados adicionales incluyen reparación de mal apareamiento puntual, mutagénesis que utiliza cepas de huésped deficientes en la reparación, selección mutagénesis por selección de restricción y restricción de purificación, mutagénesis de eliminación, mutagénesis por una síntesis genética total, reparación de rupturas de cadena doble y similares. En la presente invención también se incluyen mutagénesis, incluso, entre otros, que implica construcciones quiméricas. En una realización, la mutagénesis puede estar guiada por información conocida de la molécula natural o molécula natural alterada o mutada, incluso, entre otros, secuencia, comparaciones de secuencias, propiedades físicas, estructura secundaria, terciara o cuaternaria, estructura cristalina o similares.

Los textos y ejemplos que se encuentran en el presente describen estos procedimientos. Existe información adicional en las siguientes publicaciones y referencias citadas en: Ling y col., Approaches to DNA mutagenesis; an overview, Anal Biochem. 254(2):157-178 (1997); Dale y col., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, Methods Mol. Biol. 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, Ann, Rev, Genet. 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, Biochem. J. 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F, y Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel y col., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, Methods in Enzymol, 154, 367-382 (1987); Bass y col., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned

into M13 vectors, Methods in Enzymol, 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, Methods in Enzymol. 154:329-350 (1987); Taylor y col., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764 (1985); Taylor y col., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, Nucl. Acids Res. 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698 (1986); Sayers y col., 5′-3′ Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayers y col., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 803-814; Kramer y col., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl, Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramer y col., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA

approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16: 7207 (1988); Fritz y col., Oligonucleotide- directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999 (1988); Kramer y col., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch- repair system of E. coli, Cell 38:879-887 (1984); Carter y col., Improved oligonucleotide site- directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using Ml3 vectors, Methods in Enzymol. 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Wells y col., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans, R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Nambiar y col., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Sakmar y Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Wells y col., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Grundstrom y col., Oligonucleotide-

directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad, Sci. USA, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Sieber, y col., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); y, I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995). Detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores se pueden encontrar en Methods in Enzymology Volume 154, que también describe controles útiles para la resolución de problemas con diversos métodos de mutagénesis.

Los oligonucleótidos, p. ej., para el uso en la mutagénesis de la presente invención, p. ej., mutar genotecas de sintetasas, o alterar ARNt, típicamente se sinterizan químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita de fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, (1981) p. ej., que utiliza un sinterizador automático, como se describe en Needham-VanDevanter y col., Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984).

La invención también se refiere a células huésped eucariotas, células huésped no eucariotas y organismos para

la incorporación in vivo de un aminoácido no natural mediante los pares ARNt/RS ortogonales. Las células huésped se modifican genéticamente (incluso, entre otros, se transforman, se transducen o transfectan) con lo polinuecleótidos de la invención o construcciones que incluyen un polinuecleótido de la invención, incluso, entre otros, un vector de la invención, que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. Por ejemplo, las regiones codificantes para el ARNt ortogonal, la sintetasa ortogonal ARNt y la proteína que se deriva están unidos funcionalmente a los elementos de control de la expresión genética que son funcionales en la célula huésped deseada. Un vector puede estar, por ejemplo, en la forma de un plásmido, un cósmido, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se introducen en las células o microorganismos a través de métodos estándar que incluyen electroporación (Fromm y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)), infección por vectores virales, penetración balística de alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico, ya sea dentro de la matriz de perlas o partículas pequeñas o en la superficie (Klein y col., Nature 327, 70-73 (1987)) o similares. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico en las células in vitro incluyen el uso de liposomas, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el

métodos de precipitación de con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia genética in vivo incluyen, entre otros, la transfección con vectores virales (típicamente retrovirales) y proteína de recubrimiento viral-transfección mediada por liposoma [Dzau y col., Trends in Biotechnology 11:205-210 (1993)]. En algunas situaciones puede ser deseable proporcionarle a la fuente de ácido nucleico un agente que apunte a las células diana, por ejemplo un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean los liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie de la célula asociada con endocitosis para apuntar o para facilitar la absorción, p. ej. de proteínas de la cápside o fragmentos de estas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclo, proteínas que apuntan la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular.

Las células huésped modificadas genéticamente se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para dichas actividades como, por ejemplo, exploración de etapas, activación de promotores o selección de transformantes. Opcionalmente, estas células se pueden cultivar en organismos transgénicos. Otras referencias

útiles, incluso, entre otros, para aislamiento y cultivo celular (p. ej., para el aislamiento posterior de un ácido nucleico) incluyen Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley- Liss, New York y las referencias citadas allí; Payne y col. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Atlas y Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Varios métodos conocidos de introducción de ácidos nucleicos diana en células están disponibles, cualquiera de los cuales puede usarse en la invención. Estos incluyen: fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, electroporación, bombardeo con proyectiles e infección con vectores virales (planteados a continuación), etc. Pueden usarse células bacterianas para amplificar el número de plásmidos que contienen construcciones de ADN de la presente invención. Las bacterias se cultivan hasta la fase logarítmica y los plásmidos dentro de las bacterias se pueden aislar por una diversidad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). Además, están disponibles en el mercado kits para la purificación de plásmidos a partir de bacterias,

(véase, p. ej., EasyPrep™, FlexiPrep™, ambos de Pharmacia Biotech; StrataClean™ de Stratagene; y, QIAprep™ de Qiagen). Los plásmidos aislados y purificados se manipulan adicionalmente para producir otros plásmidos, se utilizan para transfectar células o se incorporan en vectores relacionados para infectar organismos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico diana particular. Los vectores comprenden opcionalmente casetes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencia que permite la replicación del casete en eucariotas, o procariotas, o ambos (incluyendo, entre otros, vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procariotas como eucariotas. Los vectores son adecuados para la replicación e integración en procariotas, eucariotas o ambos. Véase, Gillam & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, y col., Nature, 328:731 (1987); Schneider, E., y col., Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (mencionados anteriormente). Se proporciona un catálogo de bacterias y bacteriófagos útiles para clonación, p. ej., por la ATCC, p. ej., The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna y col. (eds) publicado por la ATCC. Los procedimientos básicos adicionales para la

secuenciación, la clonación y otros aspectos de la biología molecular y consideraciones teóricas subyacentes también se encuentran en Watson y col. (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. Además, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, tanto convencional como no convencional) puede pedirse de forma personalizada o convencional en cualquiera de una diversidad de fuentes comerciales, tales como Midland Certified Reagent Company (Midland, TX disponible en línea en mcrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA disponible en línea en genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL disponible en línea en expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras.

CODONES SELECTORES

Los codones selectores de la invención expanden el marco de codones genéticos de la maquinaría biosintética de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluso, entre otros, un codón de tres bases único, un codón sin sentido, por ejemplo un codón de parada, incluso, entre otros, un codón ámbar (UAG), un codón ocre, o un codón ópalo (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro o más bases, un codón raro o similares. Es fácilmente evidente para el entendido en la técnica que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que se pueden introducir en un gen o

polinucleótido deseado, incluso, entre otros, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de un único polinucleótido que codifica al menos una parte del polipéptido de relaxina. Es fácilmente evidente para el entendido en la técnica que existe un amplio intervalo en el número de codones selectores que se pueden introducir en un gen o polinucleótido deseado, incluso, entre otros, uno o más, dos o más, tres o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más total encontrado en las secuencias de poinucleótidos de cadena A y de cadena B que codifican al menos una parte del polipéptido de relaxina.

En una realización, los métodos comprenden el uso de un codón selector que es un codón de parada para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales in vivo. Por ejemplo, se produce un O-ARNt que reconoce el codón de parada, incluso, entre otros, UAG, y se aminoacila por una O-RS con un aminoácido no natural deseado. Este O-ARNt no se reconoce por las aminoacil-ARNt sintetasas del huésped natural. Se puede utilizar mutagénesis de sitio dirigido convencional para introducir el codón de parada, incluso, entre otros, TAG, en el sitio de interés en un polipéptido de interés. Véase, p. ej., Sayers, J.R., y col. (1988), 5’-3’ Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res, 16:791-802. Cuando la O-RS, O-ARNt y el ácido nucleico que codifica el

polipéptido de interés se combinan in vivo, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para proporcionar un polipéptido que contiene el aminoácido no natural en la posición especificada.

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

Los aminoácidos no naturales también se pueden codificar con codones raros. Por ejemplo, cuando la concentración de arginina en una reacción de síntesis de proteína in vitro se reduce, el codón de arginina raro, AGG, ha resultado ser eficaz para la inserción de Ala por un ARNt sintético acilado con alanina. Véase, p. ej., Ma y col., Biochemistry, 32:7939 (1993). En este caso, el ARNt sintético compite con el tRNAArg natural, que existe como una especio minoritaria en Escherichia coli. Algunos organismos no utilizan todos los codones tripletes. Un codón no asignado a AGA en Micrococcus luteus se ha utilizado para la inserción

de aminoácidos en un extracto de transcripción/traducción in vitro. Véase, p. ej., Kowal y Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997). Los componentes de la presente invención se pueden generar para utilizar estos codones raros in vivo.

Los codones selectores también compren codones extendidos, incluso, entre otros, codones de cuatro o más bases, como codones de cuatro, cinco, seis o más bases. Ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, entre otros, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Ejemplos de codones de cuatro bases incluyen, entre otros, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC y similares. Una característica de la invención incluye utilizar codones extendidos basados en supresión de desplazamiento de fase. Se pueden insertar codones de cuatro o más bases, incluso, entre otros, uno o múltiples aminoácidos no naturales en la misma proteína. Por ejemplo, en presencia de O-ARNt mutados, incluso, entre otros, un ARNt supresor de desplazamiento de fase especial, con bucles anticodónicos, por ejemplo, con bucles anticodónicos de al menos 8-10 nt, el codón de cuatro o más bases se lee como un solo aminoácido. En otras realizaciones, los bucles anticodónicos pueden descodificar, incluso, entre otros, al menos un codón de cuatro bases, al menos un codón de cinco bases, al menos un codón de seis bases o más. Debido a que hay 256 posibles codones de cuatro bases, se pueden codificar múltiples aminoácidos no naturales en la misma

célula usando un codón de cuatro o más bases. Véase, Anderson y col., (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol, Biol. 307: 755-769.

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

reducir la lectura en sentido equivocado y la supresión de desplazamiento de fase en otros sitios no deseados.

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

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

Para el uso in vivo, el nucleósido no natural es permeable a membrana y se fosforila para formar el trifosfato correspondiente. Además, la información genética aumentada es estable y no se destruye por enzimas celulares. Los intentos anteriores de Benner y otros aprovecharon los patrones de enlaces de hidrógeno que son diferentes de los de los pares de Watson-Crick canónicos, el ejemplo más notable de ellos el par iso-C:iso-G. Véase, p. ej., Switzer y col., (1989) J, Am. Chem. Soc., 111:8322; y Piccirilli y col., (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602. Estas bases en general se emparejan de forma errónea en cierto grado con bases naturales y no se pueden replicar de forma enzimática. Kool y colaboradores demostraron que las interacciones de empaquetamiento hidrófobo entre bases pueden reemplazar los enlaces de hidrógeno para dirigir la formación de pares de bases. Véase, Kool, (2000) Curr. Opin. Chem, Biol., 4:602; y Guckian y Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825. En un esfuerzo por desarrollas un par de bases no natural que satisfaga todos los requisitos anteriores, Schultz, Romesberg y colaboradores han sintetizado sistemáticamente y estudiado una serie de bases hidrofóbicas no naturales. Se ha descubierto que un autopar PICS:PICS es más estable que los pares de bases naturales y se puede incorporar de manera eficaz en el ADN por el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de Escherichia

coli (KF). Véase, p. ej., McMinn y col., (1999) J, Am. Chem. Soc., 121:11585-6; y Ogawa y col., (2000) J, Am, Chem. Soc., 122:3274. Un autopar 3MN:3MN se puede sinterizar por KF con eficacia y selectividad suficientes para la función biológica. Véase, p. ej., Ogawa y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803. Sin embargo, ambas bases actúan como un terminador de cadena para replicación adicional. Recientemente se ha desarrollado un DNA polimerasa mutante que se puede utilizar para replicar el autopar PICS. Además, un autopar 7AI se puede replicar. Véase, p. ej., Tae y col., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439. Un nuevo par de metalobases, Dipic:Py, también se ha desarrollado, que forma un par estable tras su unión con Cu(II). Véase, Meggers y col., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714. Debido a que los codones extendidos y los codones no naturales son intrínsecamente ortogonales a los codones naturales, los métodos de la invención pueden aprovechar esta propiedad para generar ARNt ortogonales para ellos.

También se puede utilizar un sistema de derivación traduccional para incorporar un aminoácido no natural en un polipéptido deseado. En un sistema de derivación traduccional, se incorpora una secuencia grande en un gen pero no se traduce en proteínas. La secuencia contiene una estructura que sirve como una señal para inducir al ribosoma

para que salte la secuencia y reanude la traducción cadena debajo de la inserción.

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

Los genes que codifican proteínas o polipéptidos de interés se pueden mutagenizar utilizando métodos conocidos para el entendido en la técnica y que se describen en el presente, los cuales incluyen, por ejemplo, uno o más codones selectores para la incorporación de un aminoácido no natural. Por ejemplo, un ácido nucleico para una proteína de interés se mutageniza para incluir uno o más codones selectores, lo que posibilita la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales. La invención incluye cualquiera de dichas variantes, incluso, entre otros, versiones mutantes de cualquier proteína, por ejemplo, incluyendo al menos un aminoácido no natural. De igual modo, la invención también incluye ácidos nucleicos correspondientes, es decir,

cualquier ácido nucleico con uno o más codones selectores que codifican uno o más aminoácidos no naturales.

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

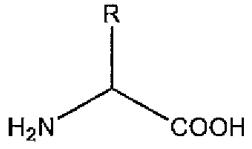
Aminoácidos codificados no naturales

Una amplia variedad de aminoácidos codificados no naturales son adecuados para el uso en la presente invención. Cualquier cantidad de aminoácidos codificados no naturales se puede introducir en un polipéptido de relaxina. En general, los aminoácidos codificados no naturales introducidos son sustancialmente químicamente inertes para los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina,

triptofan, tirosina y valina). En algunas realizaciones, los aminoácidos codificados no naturales incluyen grupos funcionales de cadenas laterales que reaccionan eficaz y selectivamente con grupos funcionales no encontrados en los 20 aminoácidos comunes (incluso, entre otros, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido de relaxina que incluye un aminoácido codificado no natural que contiene un grupo funcional azido puede hacerse reaccionar con un polímero (incluso, entre otros, poli(etilenglicol) o, alternativamente, un segundo polipéptido que contiene una fracción alquino para formar un conjugado estable que resulte de la reacción selectiva de los grupos funcionales de azida y alquino para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2].

La estructura genérica de un aminoácido alfa se ilustra de la siguiente forma (fórmula I):

I



Un aminoácido codificado no natural es típicamente cualquier estructura que tienen la fórmula anterior en donde el grupo R es cualquier sustituyente distinto del utilizado en los veinte aminoácidos naturales, y puede ser adecuado

para el uso en la presente invención. Debido a que los aminoácidos codificados no naturales de la invención típicamente difieren de los aminoácidos naturales solamente en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos codificados no naturales de amida se unen con otros aminoácidos, incluso, entre otros, codificados naturales o no naturales, del mismo modo en el que se forman en los polipéptidos naturales.

Sin embargo, los aminoácidos codificados no naturales tienen grupos de cadenas laterales que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquil-, aril-, acil-, ceto-, azido-, hidroxil-, hidrazina, ciano-, halo-, hidrazida, alquenil, alquinil, éter, tiol, seleno-, sulfonil-, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfino, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos no naturales de interés que pueden ser adecuados para el uso en la presente invención incluso, entre otros, aminoácidos que comprenden un agente de reticulación fotoactivable, aminoácidos con marcadores de spin, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de unión a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radiactivos, aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interactúan por enlace covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos

fotoliberadores y/o fotoisomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glicosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o fotoescindibles, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales, incluso, entre otros, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluso, entre otros, mayores de aproximadamente 5 o mayores de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcar ligado a carbono, aminoácidos activos para redox, aminoácidos que contienen aminotioácidos, y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

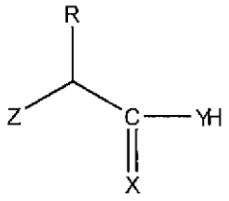
Los aminoácidos codificados no naturales que pueden ser adecuados para el uso en la presente invención y que son útiles para las reacciones con polímeros solubles en agua incluso, entre otros, los que tienen grupos reactivos de carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas realizaciones, los aminoácidos codificados no naturales comprenden una fracción sacárida. Ejemplos de dichos aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-Lglucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-

asparagina y O-manosaminil-L-serina. Ejemplos de dichos aminoácidos también incluyen ejemplos en donde el enlace N- u O- natural entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente no hallado habitualmente en la naturaleza -incluso, entre otros, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Ejemplos de dichos aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran habitualmente en proteínas naturales tales como 2-desoxiglucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

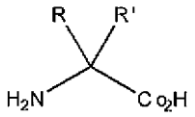
Muchos de los aminoácidos codificados no naturales proporcionados aquí están disponibles en el mercado, p. ej., por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania), o Peptech (Burlington, MA, EUA). Los que no están disponibles en el mercado se opcionalmente sintetizan como se proporciona en el presente o utilizando métodos convencionales conocidos por los entendidos en la técnica. En relación con las técnicas de síntesis orgánica, véase, p. ej., Organic Chemistry por Fessendon y Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry por March (Third Edition, 1985, Wiley y Sons, New York); y Advanced Organic Chemistry por Carey y Sundberg (Third Edition, Partes A y B, 1990, Plenum Press, Nueva York). Véase, también, patentes estadounidenses N.°7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan al presente por referencia. Además de aminoácidos

no naturales que contienen cadenas laterales nuevas, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención también comprenden opcionalmente estructuras de cadena principal modificada, incluso, entre otros, como ilustran las estructuras de las fórmulas II y III:

II



III



en donde Z típicamente comprende OH, NH_2, SH, NH-R' o S-R'; X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, típicamente comprenden S u O, y R y R', que opcionalmente son iguales o diferentes, típicamente se seleccionan de la misma lista de componentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la fórmula I e hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la invención opcionalmente comprenden sustituciones en el grupo amino o carboxilo como ilustran las fórmulas II y III. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, entre otros, a-hidroxiácidos, a-tioácidos, a-aminotiocarboxilatos,

incluso, entre otros, con cadenas laterales correspondientes a los veinte aminoácidos naturales comunes o cadenas laterales no naturales. Además, las sustituciones en el carbono a opcionalmente incluyen, entre otros, aminoácidos L, D o α-α disustituidos tales como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cíclicos, por ejemplo análogos de prolina, así como análogos de prolina de anillo de 3, 4 , 6, 7, 8 y 9 miembros, β y γ aminoácidos como β-alanina sustituida y ácido γ-aminobutírico.

Muchos aminoácidos no naturales están basados en aminoácidos no naturales como tirosina, glutamina, fenilalanina y similares, y son adecuados para su uso en la presente invención. Los análogos de tirosina incluyen, entre otros, tirosinas sustituidas en posición para, tirosinas sustituidas en posición orto y tirosinas sustituidas en posición meta, en donde la tirosina sustituida comprende, incluso, entre otros, un grupo ceto (incluso, entre otros, un grupo acetilo), un grupo benzoílo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo C6 - C20 de cadena lineal o ramificado, un hidrocarburo saturado o insaturado, una grupo O-metilo, un grupo poliéter, un grupo nitro, un grupo alquinilo o similares. Además, también se contemplan anillos de arilo con múltiples sustituciones.

Además, también se contemplan los anillos aril sustituidos múltiples. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, derivados de a-hidroxi, derivados g-sustituidos, derivados cíclicos y derivados de glutamina sustituidos con amida. Los análogos de fenilalanina ejemplares que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, fenilalaninas sustituidas en posición para, fenilalaninas sustituidas en posición orto y fenilalaninas sustituidas en posición meta, en las que el sustituyen comprende, incluso, entre otros, un grupo hidroxi, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un yodo, un bromo, un grupo ceto (incluso, entre otros, un grupo acetilo) , un benzoílo, un grupo alquinilo o similares. Ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen, entre otros, una p-acetil-L-fenilalanina, una O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc-serina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-aminoL-fenilalanina, una isopropil-

L-fenilalanina y una p-propargiloxi-fenilalanina y similares. Ejemplos de estructuras de una variedad de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuadas par su uso en la presente invención se proporcionan, por ejemplo, en WO 2002/085923 titulada "In vivo incorporation of unnatural amino acids." Véase también Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, que se incorpora al presente por referencia, para análogos de metionina adicionales. La solicitud internacional N.°PCT/US06/47822 titulada "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides," que se incorpora al presente por referencia, describe la alquilación reductiva de fracciones de amina aromáticas, incluso, entre otros, paminofenilalanina y aminación reductiva.

En una realización, se proporcionan las composiciones de un polipéptido de relaxina que incluye un aminoácido no natural (por ejemplo p-(propargiloxi)-fenilalanina). También se proporcionan diversas composiciones que comprenden p-(propargiloxi)-fenilalanina e, incluso, entre otros, proteínas o células. En un aspecto, una composición que incluye el aminoácido no natural p-(propargiloxi)-fenilalanina además incluye un ARNt ortogonal. El aminoácido no natural puede estar unido (incluso, entre otros, por enlace covalente) al ARNt ortogonal, incluso, entre otros, la

unión covalente con el ARNt ortogonal a través de un enlace de aminoacilo, la unión covalente con un 3'OH o un 2'OH de un azúcar ribosa terminal del ARNt ortogonal, etc.

Las fracciones químicas a través de aminoácidos no naturales que se pueden incorporar en proteínas ofrecen diversas ventajas y manipulaciones de la proteína. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional ceto permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de varios reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina in vitro e in vivo. Un aminoácido no natural con átomos pesados, por ejemplo, puede ser útil para el cálculo de las fases de datos de estructura de rayos X. La introducción específica de sitio de átomos pesados usando aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la selección de posiciones para átomos pesados. Los aminoácidos no naturales fotorreactivos (incluso, entre otros, aminoácidos con cadenas laterales de benzofenona y arilazidas (incluso, entre otros, fenilazida)), por ejemplo, permiten la fotorreticulación in vivo e in vitro eficaz de proteínas. Ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, entre otros, p-azido-fenilalanina y p-benzoil-fenilalanina. La proteína con los aminoácidos no naturales fotorreactivos después se puede reticular a voluntad por excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo, el grupo metilo de un

aminoácido no natural se puede sustituir, incluso, entre otros, por un grupo metilo marcado con isótopos, como una sonda de estructura local y dinámica, incluso, entre otros, con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia de vibración. Por ejemplo, los grupos funcionales alquinilo o azido permiten la modificación selectiva de proteínas con moléculas a través de una reacción de cicloadición [3+2].

Un aminoácido no natural incorporado en un polipéptido en el extremo amino terminal puede estar compuesto por un grupo R que es cualquier sustituyente distinto del usado en los veinte aminoácidos naturales y un 2° grupo reactivo diferente del grupo NH2 normalmente presente en los α-aminoácidos (véase la fórmula I). Se puede incorporar un aminoácido no natural similar en el extremo carboxilo terminal con un 2° grupo reactivo diferente del grupo COOH normalmente presente en los α-aminoácidos (véase la fórmula I).

Los aminoácidos no naturales de la invención se pueden seleccionar o diseñar para proporcionar características adicionales no disponibles en los veinte aminoácidos naturales. Por ejemplo, el aminoácido no natural opcionalmente se puede diseñar o seleccionar para modificar las propiedades biológicas de una proteína, por ejemplo, en la que se incorporan. Por ejemplo, las siguientes propiedades se pueden modificar opcionalmente por inclusión de un

aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, solubilidad, estabilidad, p. ej., resistencia térmica, hidrolítica u oxidativa a la degradación enzimática y similares, facilidad de purificación y procesamiento, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas y/o fotoquímicas, actividad catalítica, potencial redox, vida media, capacidad para reaccionar con otras moléculas, p. ej., de forma covalente o de forma no covalente y similares.

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

En algunas realizaciones la presente invención proporciona una relaxina unida a un polímero soluble en agua, p. ej., un PEG, mediante un enlace oxima.

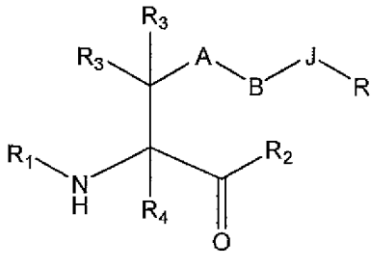
Muchos tipos de aminoácidos codificados no naturales son adecuados para la formación de enlaces oxima. Estos incluyen, entre otros, aminoácidos codificados no naturales que contienen un grupo carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Dichos aminoácidos se describen en las publicaciones de patentes estadounidenses N.°2006/0194256, 2006/0217532, y 2006/0217289 y WO 2006/069246 titulada “Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides”, que se incorporan al presente por referencia. Aminoácidos codificados no naturales

también se describen en la patente estadounidense N.°7.083.970 y patente estadounidense N.°7.045.337, que se incorporan al presente en su totalidad por referencia.

Algunas realizaciones de la invención utilizan polipéptidos de relaxina que están sustituidos en una o más posiciones con un aminoácido para-acetil fenilalanina. La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen in Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), incorporado por referencia. Un entendido en la técnica puede preparar de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo. Además, las síntesis ejemplares no limitantes de un aminoácido no natural que se incluyen aquí se presentan en las figuras 4, 24-34 y 36-39 de la patente estadounidense N.°7.083.970, que se incorpora al presente por referencia en su totalidad.

Los aminoácidos con un grupo reactivo electrófilo permiten diversas reacciones para unir las moléculas a través de reacciones de adición nucleófila, entre otras. Dichos grupos reactivos electrófilos incluyen un grupo carbonilo (incluso un grupo ceto y un grupo dicarbonilo), un grupo similar a carbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluso un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo), un grupo carbonilo enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo carbonilo (incluso un grupo

ceto y un grupo dicarbonilo)), o un grupo carbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo (incluso un grupo ceto y un grupo dicarbonilo) tras la desprotección). Dichos aminoácidos incluyen aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (IV):



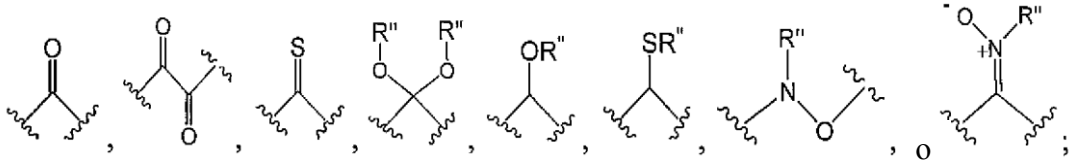
(IV),

en donde:

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

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno

sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2 o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')$, -N(R')C(O)N(R'), -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

J es  , o ;

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

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

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

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

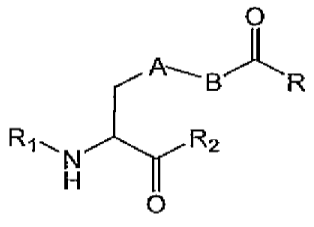
cada uno de R_3 y R_4 es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o los grupos R_3 y R_4 o dos R_3 opcionalmente forman un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

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

o los grupos -J-R juntos forman un cicloalquilo o heterocicloalquilo monocíclico o bicíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, incluyendo un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, incluyendo un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, incluyendo un grupo dicarbonilo enmascarado;

con la condición de que cuando A sea fenileno y cada R_3 sea H, B esté presente; y de que cuando A sea $-(CH_2)_4-$ y cada R_3 sea H, B no sea $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y de que cuando A y B estén ausentes cada R_3 sea H, R no sea metilo.

Además, teniendo la estructura de la fórmula (V) se incluyen:



(V),

en donde:

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

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2 o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)- (alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno

sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R'), $-N(R')S(O)_kN(R')$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

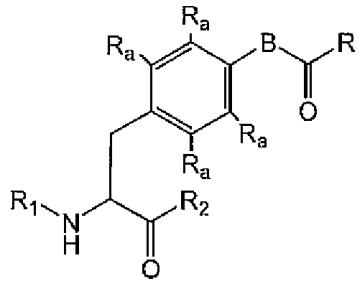
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

con la condición de que cuando A sea fenileno, B esté presente; y de que cuando A sea $-(CH_2)_{4-}$; B no sea $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$; y de que cuando A y B estén ausentes, R no sea metilo.

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



(VI),

en donde:

B es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2 o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, - N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

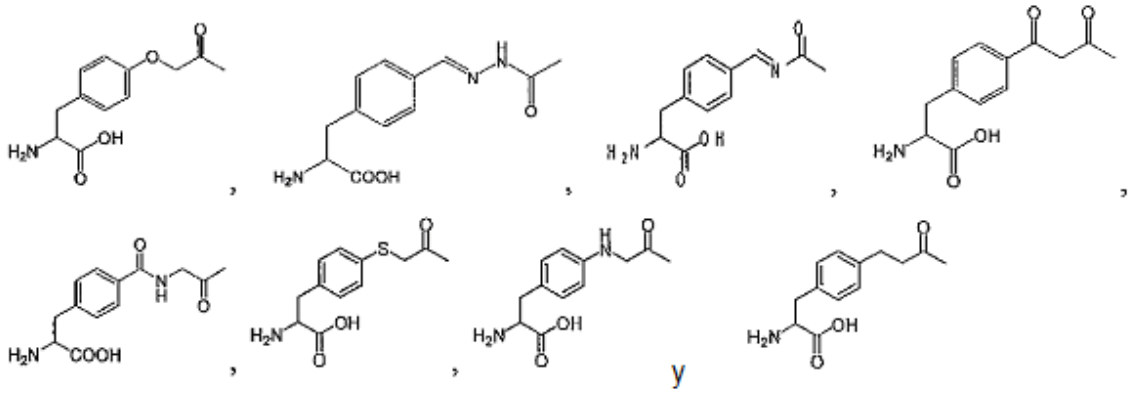
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

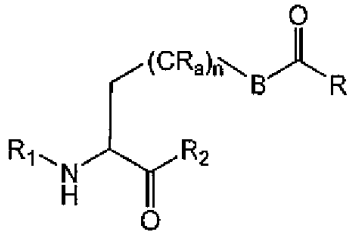
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



y

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

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



(VII)

en donde

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$ y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

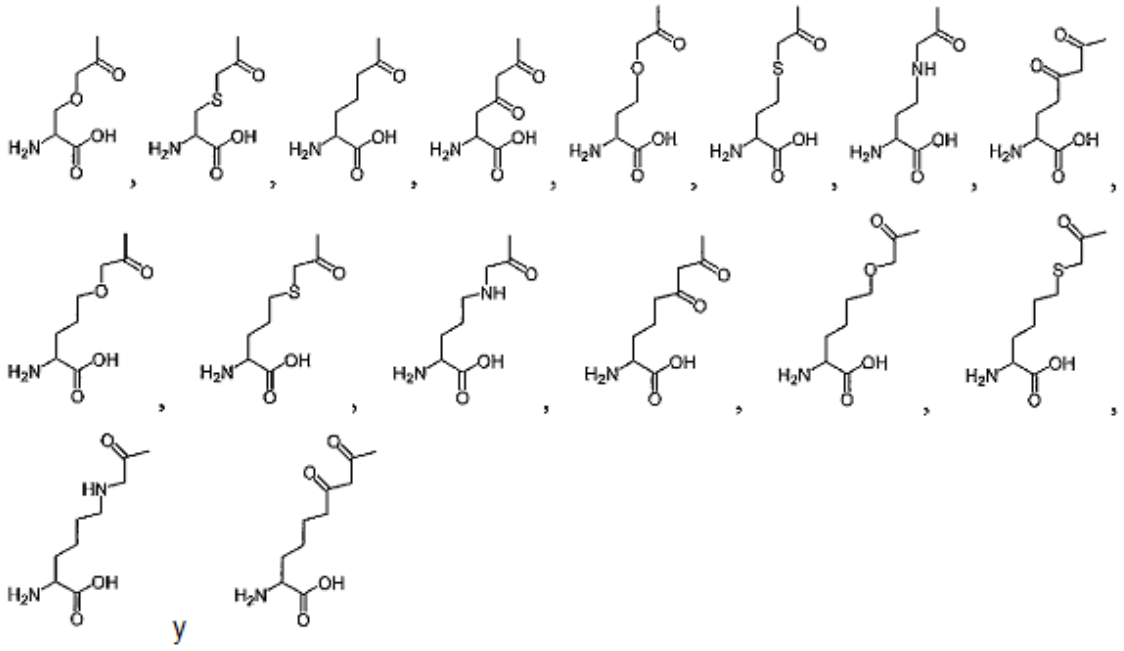
R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en donde k es 1, 2, o 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, y $-S(O)_kR'$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido; y n es de 0 a 8;

con la condición de que cuando A sea $-(CH_2)_4-$, B no sea $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$.

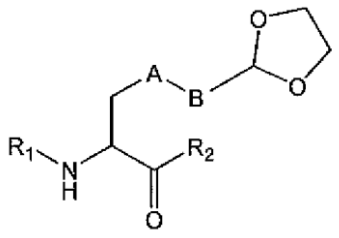
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



y

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

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



(VIII),

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

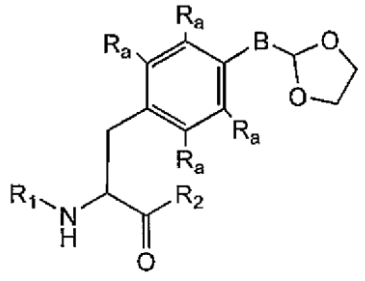
B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno

o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

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

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

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



(IX),

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno

sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R'), $-N(R')S(=)_kN(R')-$, -N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

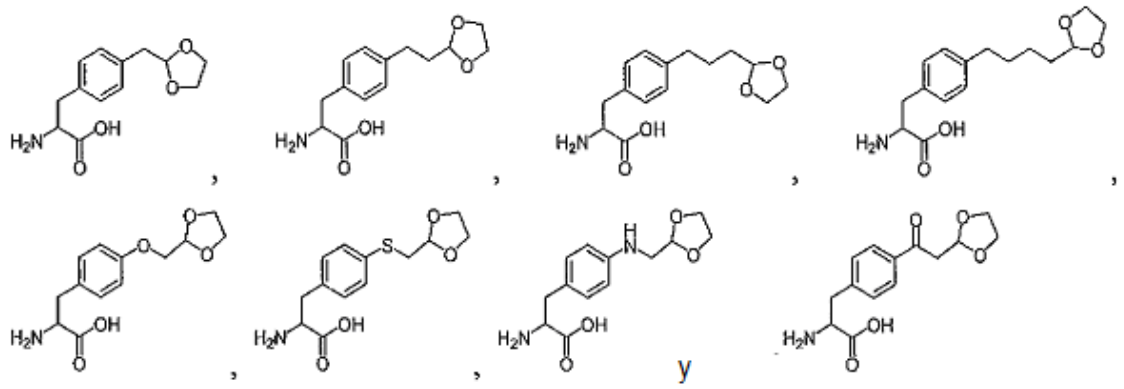
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

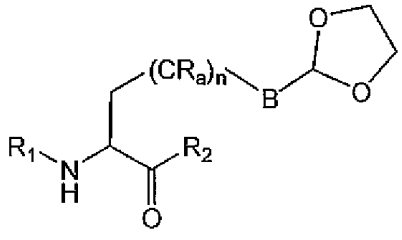
en donde cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en donde k es 1, 2, o 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', y $-S(O)_kR'$ en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



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

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



(X),

en done B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, -

$S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-$N(R')-, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

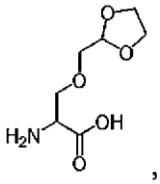
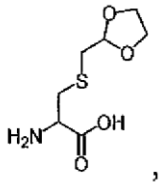
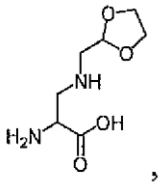
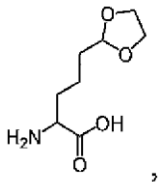
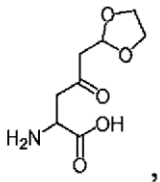
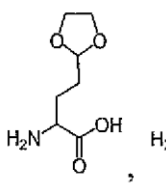
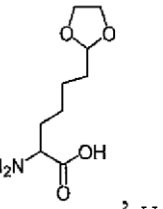
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

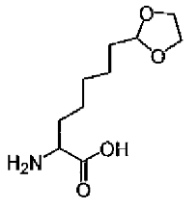
R1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

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

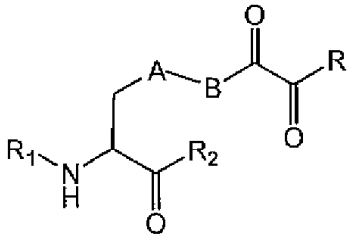
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:








, y


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

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

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


(XI),

en donde A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno

inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

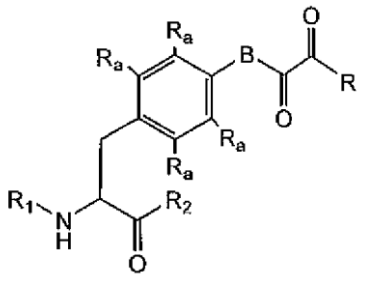
B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, O-(alquileno o alquileno sustituido)-,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

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

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

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

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



(XII),

B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o

alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)$_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R'), -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)$_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')$_2$-N=N-, y -C(R')$_2$-N(R')-N(R'), en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

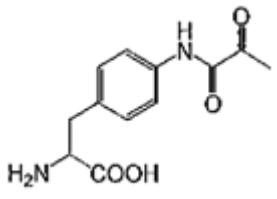
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

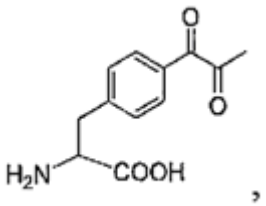
R2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

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

Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



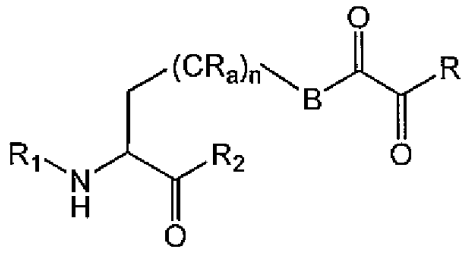
y



, en donde dichos compuestos son opcionalmente amino protegido, opcionalmente

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

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



(XIII),

en donde B es opcional, y cuando está presente es un ligador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, $-S(O)_k-$ en donde k es 1, 2, o 3, $-S(O)_k$(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R'), -

$N(R')C(S)N(R')$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N-N=$, $-C(R')_2-N=N-$, y $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

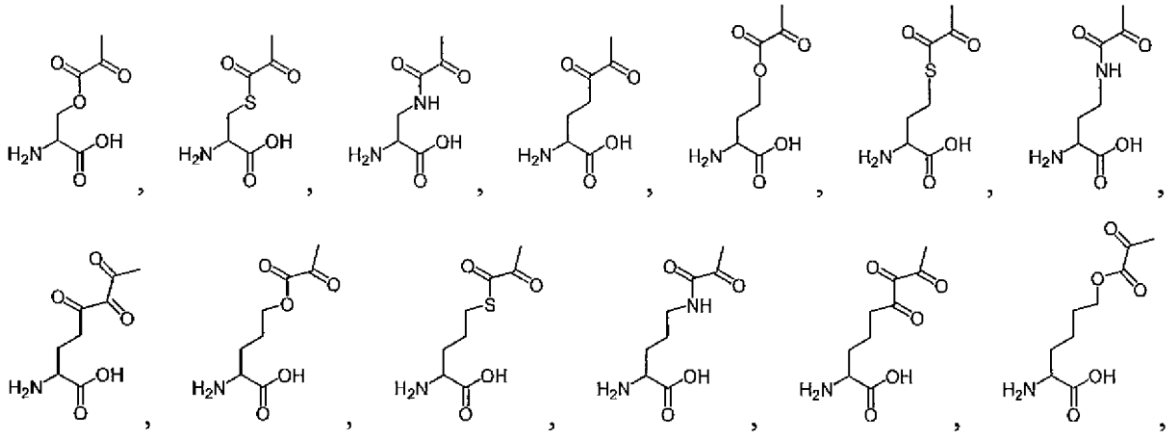
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

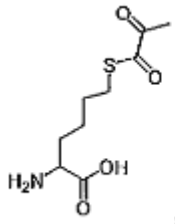
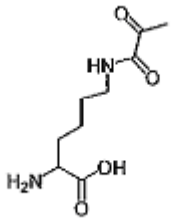
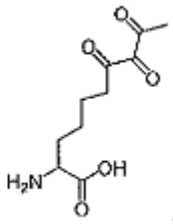
R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ en donde k es 1, 2, o 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', y $-S(O)_kR'$, en donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es de 0 a 8.

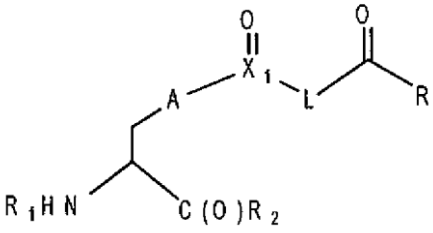
Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:





y


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

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


(XIV);

en donde:

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

alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

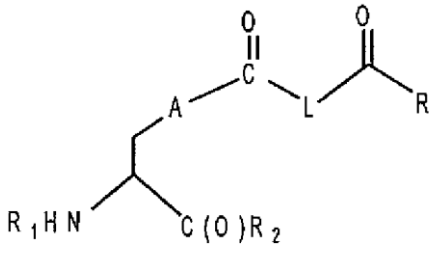
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

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



(XIV-A)

en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno

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

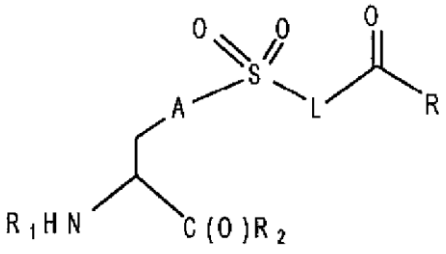
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

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



(XIV-B)

en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno

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

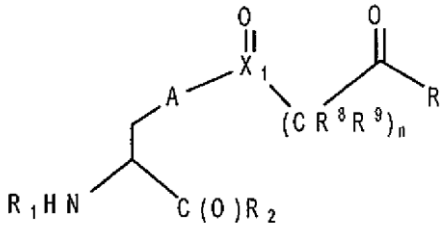
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

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



(XV);

en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior,

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

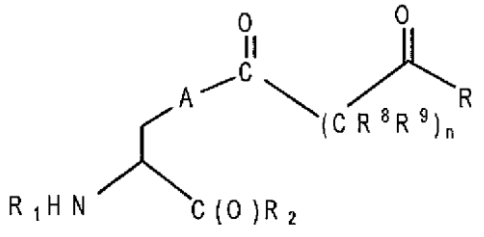
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

X_1 es C, S o S(O); y n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R^8 y R^9 en cada grupo CR^8R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R^8 y R^9 pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R^8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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



(XV-A)

en donde:

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

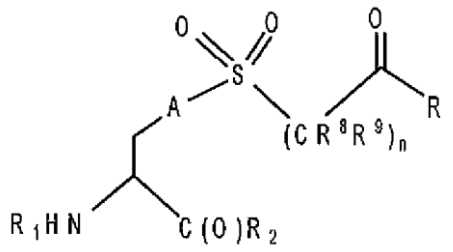
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R^8 y R^9 en cada grupo CR^8R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R^8 y R^9 pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R^8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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



(XV-B)

en donde:

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

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

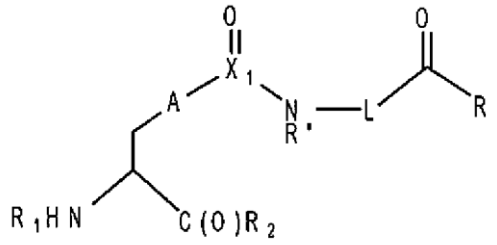
R_1 es opcional, y cuando está presente es H, un grupo amino protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

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

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R^8 y R^9 en cada grupo CR^8R^9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo o cualquier R^8 y R^9 pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquiera

de los grupos R^8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

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



(XVI);

en donde:

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

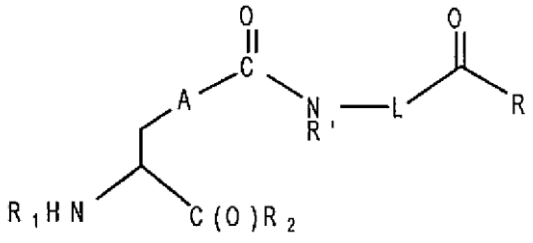
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

X_1 es C, S o S(O); y L es alquileno, alquileno sustituido, N(R')(alquileno) o N(R')(alquileno sustituido), en donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

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



(XVI-A)

en donde:

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

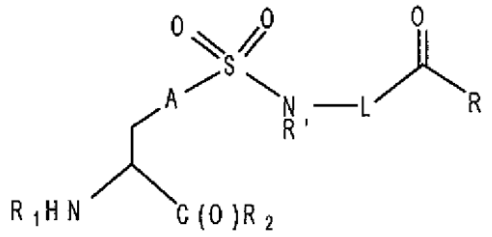
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

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



(XVI-B)

en donde:

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

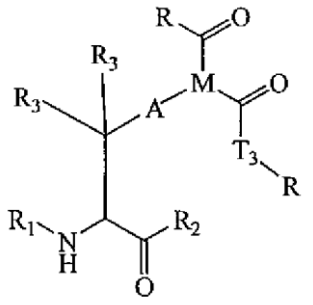
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

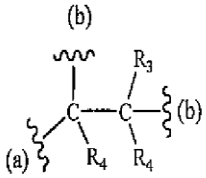
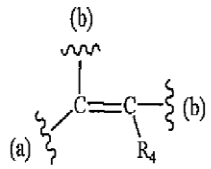
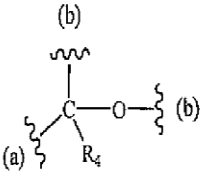
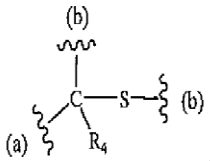
Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (XVII):

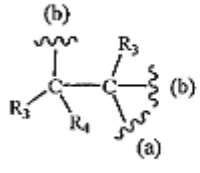
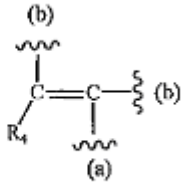
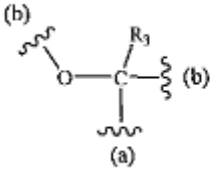
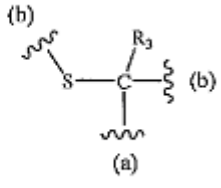


(XVII),

en donde:

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

M es $-C(R_3)-$,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  o  ,

en donde

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

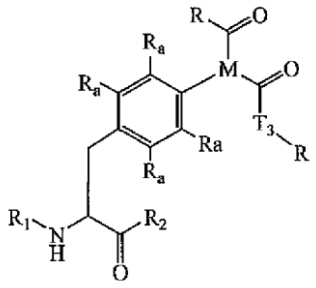
R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

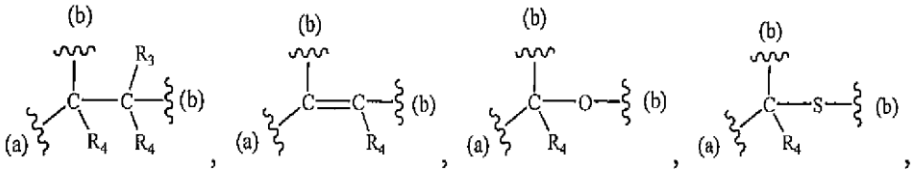
R_2 es opcional, y cuando está presente es OH, un grupo éster protector, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

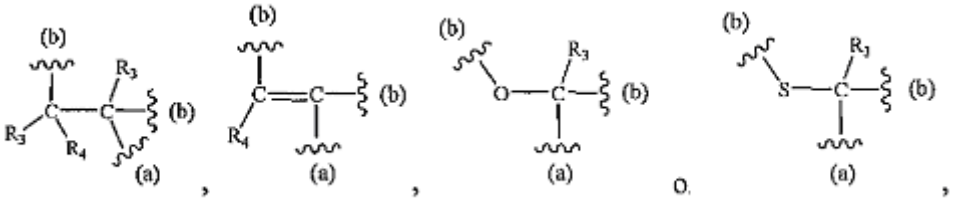
Además, se incluyen los aminoácidos que tienen la estructura de la fórmula (XVIII):



(XVIII),

en donde:

M es $-C(R_3)-$, 



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

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

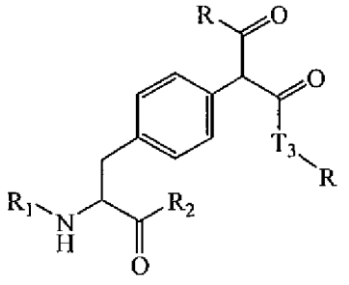
T_3 es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

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

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

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

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



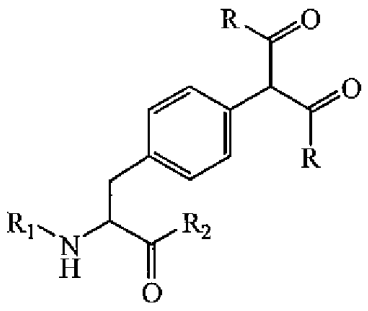
(XIX),

en donde:

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

T_3 es O o S.

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

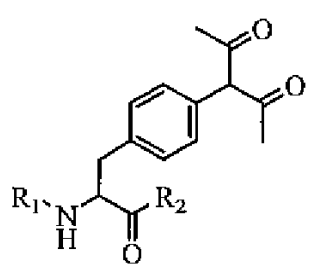


(XX),

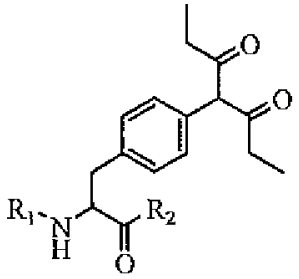
en donde:

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

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



, y



.

En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un carbonilo reactivo o un grupo funcional dicarbonilo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad de aldehído útil para la conjugación de reacciones de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede utilizar una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o se puede exponer mediante digestión química o enzimática) para generar

una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa moderadas usando periodato. Véase, p. ej., Gaertner, y col., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner y col., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo amino terminal del péptido o la proteína.

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

La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo se pueden hacer reaccionar selectivamente con un reactivo que contienen

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

Estructura y síntesis de loa aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina

La solicitud de patente estadounidense N.°11/316,534 (publicación estadounidense N.°20060189529) se incorpora al presente por referencia en su totalidad. Por lo tanto, la divulgación proporcionada en Sección V (titulada "Aminoácidos no naturales"), Parte B (titulada "Estructura y síntesis de loa aminoácidos no naturales: aminoácidos que contienen hidroxilamina"), en la solicitud de patente estadounidense N.°11/316.534 (publicación estadounidense N.°20060189529) se aplica por completo a los métodos, composiciones (incluso las fórmulas I-XXXV), técnicas y estrategias para fabricar, purificar, caracterizar y utilizar los aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y

polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en el presente en la misma medida en que si dichas divulgaciones se presentaran completamente en el presente. Las publicaciones de patentes estadounidenses N.º2006/0194256, 2006/0217532, y 2006/0217289 y WO 2006/069246 titulada "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides", también se incorporan al presente por referencia en su totalidad.

SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para su uso en la presente invención están disponibles en el mercado, p. ej., por Sigma (EUA) o Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Los que no están disponibles en el mercado se sintetizan opcionalmente como se proporciona en el presente o en varias publicaciones o utilizando métodos convencionales conocidos por los entendidos en la técnica. En relación con las técnicas de síntesis orgánica, véase, p. ej., Organic Chemistry por Fessendon y Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry por March (Third Edition, 1985, Wiley y Sons, New York); y Advanced Organic Chemistry por Carey y Sundberg (Third Edition, Parts A y B, 1990, Plenum Press, New York). Publicaciones adicionales que describen la síntesis de aminoácidos no naturales incluyen, p. ej., WO 2002/085923

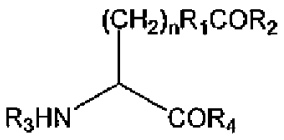
titulada "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids;" Matsoukas y col., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ-Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterrji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. y col. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-l-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M, & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)- Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton y col., (1987) Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L- alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; y, Subasinghe y col., (1992) Quisqualic acid analogues:

synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. Véase también, publicación de patente estadounidense N.° 2004/0198637 titulada "Protein Arrays", que se incorpora al presente por referencia.

A. Grupos carbonilo reactivos

Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten una diversidad de reacciones para unir moléculas (incluso, entre otros, PEG u otras moléculas solubles en agua) a través de una adición nucleófila o reacciones de condensación con aldol, entre otras.

Aminoácidos que contienen carbonilo se pueden representar de la siguiente forma:



en donde n es 0-10; R_1 es un alquil, aril, alquil sustituido o aril sustituido; R_2 es H, un alquil, aril, alquil sustituido y aril sustituido; y R_3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R_4 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo y R_2 es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción

cetona se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo y R_2 es un alquilo sencillo (es decir, metilo, etilo o propilo) y la fracción cetona se ubica en la posición meta respecto a la cadena lateral alquilo.

La síntesis de p-acetil-(+/-)-fenilalanina y m-acetil-(+/-)-fenilalanina se describen in Zhang, Z., y col., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), que se incorpora al presente por referencia. Un entendido en la técnica puede preparar de forma análoga otros aminoácidos que contienen carbonilo.

En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido codificado no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional carbonilo. Por ejemplo, se puede generar una funcionalidad de aldehído útil para la conjugación de reacciones de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede utilizar una serina o treonina N-terminal (que puede estar presente normalmente o se puede exponer mediante digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa moderadas usando periodato. Véase, p. ej., Gaertner, y col., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner y col., J.

Biol Chem, 269:7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica se limitan al aminoácido en el extremo amino terminal del péptido o la proteína.

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

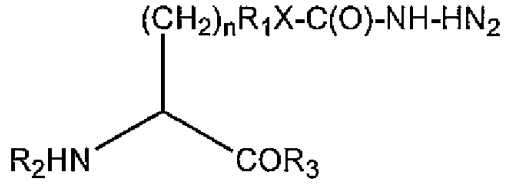
La funcionalidad carbonilo puede reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones moderadas en una solución acuosa para formar las uniones de hidrazona, oxima o semicarbazona correspondientes, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véase, p. ej., Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc,

81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, J, P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). Por otra parte, Además, la única reactividad del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las demás cadenas laterales de los aminoácidos. Véase, p. ej., Cornish, V. W., y col., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., y col., Science 276:1125-1128 (1997).

B. Grupos reactivos de hidrazina, hidrazida o semicarbazida

Los aminoácidos codificados no naturales que contienen un que contienen un grupo nucleófilo, por ejemplo una hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con una diversidad de grupos electrófilos para formar conjugados (incluso, entre otros, con PEG u otros polímeros solubles en agua).

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



en donde n es 0-10; R_1 es un alquil, aril, alquil sustituido o aril sustituido o no está presente; X es O, N, o S o no está presente; R_2 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R_3 es H,

un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal.

En algunas realizaciones, n es 4, R_1 no está presente y X es N. En algunas realizaciones, n es 2, R_1 no está presente y X no está presente. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo, X es O y el átomo de oxígeno se ubica en la posición para con respecto al grupo alifático en el anillo arilo.

Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida están disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, L-glutamato-□-hidrazida se encuentra disponible por Sigma Chemical (St. Louis, MO). Un entendido en la técnica puede preparar otros aminoácidos que no estén disponibles en el mercado. Véase, p. ej., patente estadounidense N. 6.281.211, que se incorporan al presente por referencia.

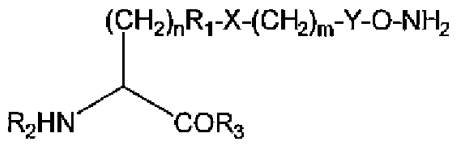
Los polipéptidos que contienen aminoácidos codificados no naturales que presentan funcionalidades hidrazida, hidrazina o semicarbazida se pueden reaccionar de forma eficaz y selectiva varias moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, p. ej., Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995). La única reactividad de grupos funcionales hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace significativamente más reactivos a los aldehídos, cetonas y otros grupos electrófilos en comparación con los grupos nucleófilos presentes en los 20 aminoácidos comunes (incluso,

entre otros, el grupo hidroxilo de la serina o la treonina o los grupos amino de la lisina y el extremo amino terminal).

C. Aminoácidos que contienen aminooxi

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

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



en donde n es 0-10; R_1 es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; Y = C(O) o no está presente; R_2 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R_3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenil, X es O, m es 1 e Y está presente. En algunas realizaciones, n es 2, R_1 y X no están presentes, m es 0 e Y no está presente.

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

D. Grupos reactivos azida y alquino

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

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

Debido a que la reacción de cicloadición de Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (véase, p. ej., Padwa, A., en Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (ed. Trost, B, M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. En 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176) en lugar de una sustitución nucleófila, la incorporación de aminoácidos codificados no naturales que tienen cadenas laterales que contienen azida y alquilo permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen selectivamente en la posición del aminoácido codifica no natural. La reacción de cicloadición que implica un polipéptido de relaxina que contienen azida o alquino se puede realizar a temperatura ambiente en condiciones acuosas mediante la adición de Cu(II)

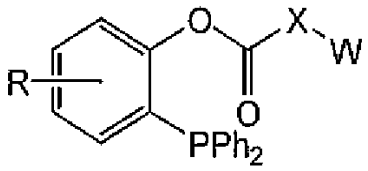
(incluso, entre otros, en forma de una cantidad catálica de $CuSO_4$) en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), in situ, en una cantidad catalítica. Véase, p. ej., Wang, Q., y col, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., y col., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, y col., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002). Agentes reductores ejemplares incluyen, entre otros, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe^{2+}, Co^{2+}, y un potencial eléctrico aplicado.

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

El grupo funcional azida también se puede reaccionar selectivamente con un polímero soluble en agua que contiene un éster arílico y puede funcionalizarse apropiadamente con una fracción aril fosfina para generar un enlace amida. El grupo aril fosfina reduce la azida in situ y la amina resultante después reacciona de forma eficaz con un enlace

éster proximal para generar la amida correspondiente. Véase, p. ej., E. Saxon y C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser un alquilazida (incluso, entre otros, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o un arilazida (p-azido-fenilalanina).

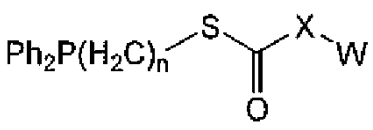
Polímeros solubles en agua que contienen un éster arílico y una fracción fosfina ejemplares se pueden representar de la siguiente forma:



en done X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, grupos alquilo sustituido y arilo sustituido. Grupos R ejemplares incluyen, entre otros, $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, -OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R", $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, -CN y $-NO_2$. R', R", R'" y R"" cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquil sustituido y no sustituido, aril sustituido y no sustituido, incluso, entre otros, aril sustituido por halógenos 1-3, alquil sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R' R", R'" y R"" cuando más de uno de estos

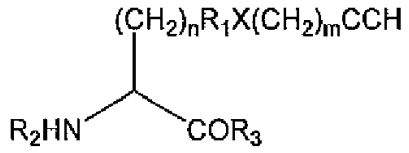
grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5-, 6-, o 7-miembros. Por ejemplo, -NR'R" implica incluir, entre otros, 1-pirrolidinil y 4-morfolinil. Del análisis de sustituyentes anterior, el entendido en la técnica entenderá que el término "alquilo" implica incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquil (incluso, entre otros, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acil (incluso, entre otros, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ y similares).

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



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

Aminoácidos que contienen alquino ejemplares se pueden representar de la siguiente forma:

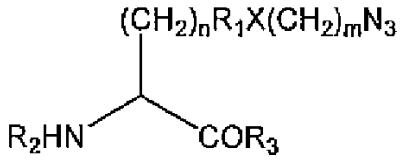


en donde n es 0-10; R_1 es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R_2 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R_3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción acetileno se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo, X s O, m es 1 y el grupo propargiloxi se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo (es decir, O-propargil-tirosina). En algunas realizaciones, n es 1, R_1 y X no están presentes y m es 0 (es decir, proparilglicina).

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la propargilglicina está disponible en el mercado en Peptech (Burlington, MA). Alternativamente, los aminoácidos que contienen alquino pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, p-propargiloxifenilalanina se puede sintetizar, por

ejemplo, como se describe en Deiters, A., y col., J. Am, Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003), y 4-alquinil-L-fenilalanina se puede sintetizar como se describe en Kayser, B., y col., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997). Un entendido en la técnica puede preparar otros aminoácidos que contienen alquino.

Aminoácidos que contienen azida ejemplares se pueden representar de la siguiente forma:



en donde n es 0-10; R_1 es un alquilo, arilo, alquilo sustituido o arilo sustituido o no está presente; X es O, N, S o no está presente; m es 0-10; R_2 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo amino terminal, y R_3 es H, un aminoácido, un polipéptido o un grupo de modificación del extremo carboxilo terminal. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo, X no está presente, m es 0 y la fracción azida se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo. En algunas realizaciones, n es 0-4 y R_1 y X no está presentes y m=0. En algunas realizaciones, n es 1, R_1 es fenilo, X es O, m es 2 y la fracción β-azidoetoxi se ubica en la posición para respecto a la cadena lateral alquilo.

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

E. Grupos reactivos aminotiol

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

aminoácido aminotiol beta-sustituido a través de la formación de la tiazolidina.

F. Grupos reactivos adicionales

Grupos reactivos adicionales y aminoácidos codificados no naturales, incluso, entre otros, para-amino-fenilalanina, que se pueden incorporar en los polipéptidos de relaxina de la invención se describen en las siguientes solicitudes de patentes que se incorporan al presente por referencia: publicación de patente estadounidense N.°2006/0194256, publicación de patente estadounidense N.°2006/0217532, publicación de patente estadounidense N.°2006/0217289, patente provisional estadounidense N.°60/755.338; patente provisional estadounidense N.°60/755,711; patente provisional estadounidense N.°60/755.018; solicitud de patente internacional N.°PCT/US06/49397; WO 2006/069246; patente provisional estadounidense N.°60/743,041; patente provisional estadounidense N.°60/743,040; solicitud de patente internacional N.°PCT/US06/47822; patente provisional estadounidense N.°60/882,819; patenten provisional estadounidense N.°60/882.500; y patente provisional N.°60/870,594. Estas solicitudes también establecen grupos reactivos que pueden estar presentes en PEG u otros polímeros, incluso, entre otros, grupos hidroxilamina (aminooxi) para la conjugación.

CAPTACIÓN CELULAR DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

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

BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO NATURALES

Ya existen muchas rutas biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Aunque es posible que en la naturaleza no exista un método biosintético para un aminoácido no natural particular,

incluso, entre otros, en una célula, la invención proporciona dichos métodos. Por ejemplo, en una célula huésped opcionalmente se generan rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales añadiendo nuevas enzimas o modificando rutas de células huésped existentes. Las nuevas enzimas adicionales son opcionalmente enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, Por ejemplo, la biosíntesis de p-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas se pueden introducir en una célula eucariota mediante la transformación de la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una ruta enzimática para sintetizar el compuesto deseado. Ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente, se proporcionan en los ejemplos a continuación. Se encuentran secuencias de enzimas adicionales, por ejemplo, en Genbank. También se añaden opcionalmente enzimas desarrolladas artificialmente a una célula de la misma manera. De este modo, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

Hay disponibles diversos métodos para producir nuevas enzimas para su uso en rutas biosintéticas o para evolución

de rutas existentes. Por ejemplo, se utiliza opcionalmente la recombinación recursiva, incluso, entre otros, como se desarrolla por Maxygen, Inc. (disponible en línea en maxygen.com), para desarrollar nuevas enzimas y rutas. Véase, p. ej., Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., 91:10747-10751. De forma similar, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en línea en genencor.com) se utiliza opcionalmente para ingeniería genética de rutas metabólicas, incluso, entre otros, para modificar por ingeniería genética una ruta para crear O-metil-Ltirosina en una célula. Esta tecnología reconstruye rutas existentes en organismos huésped utilizando una combinación de nuevos genes incluso, entre otros, los identificados a través de genómica funcional, y evolución y diseño molecular. Diversa Corporation (disponible en línea en diversa.com) también proporciona tecnología para explorar rápidamente bibliotecas de genes y rutas de genes incluso, entre otros, para crear nuevas rutas.

Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética modificada por ingeniería genética de la invención se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficaz, incluso, entre otros, una

cantidad celular natural, pero no hasta un grado tal que afecte a la concentración de los otros aminoácidos o agote los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas in vivo de este modo son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que la célula se transforma con un plásmido que comprende los genes utilizados para producir enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, se utilizan las selecciones in vivo opcionalmente para optimizar adicionalmente la producción del aminoácido no natural tanto para síntesis de proteínas ribosomales como para crecimiento celular.

POLIPÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS NO NATURALES

La incorporación de un aminoácido no natural puede realizarse para diversos fines, incluso, entre otros, adaptar cambios en la estructura o función de una proteína, cambiar el tamaño, acidez, nucleofilicidad, enlaces de hidrógeno, hidrofobicidad, accesibilidad de los sitios diana de proteasa, dirección a una fracción (incluso, entre otros, para una matriz proteica), añadir una molécula biológicamente activa, unir un polímero, unir un radionúclido, modular la vida media en suero, modular la penetración tisular (p. ej., tumores), modular el transporte activo, modular la especificidad o distribución en un tejido, célula u órgano, modular la inmunogenicidad, modular la resistencia a proteasa, etc. Las proteínas que incluyen un aminoácido no

natural pueden tener propiedades biofísicas o catalíticas mejoradas o incluso completamente nuevas. Por ejemplo, las siguientes propiedades se modifican opcionalmente por inclusión de un aminoácido no natural en una proteína: toxicidad, biodistribución, propiedades estructurales, propiedades espectroscópicas, propiedades químicas o fotoquímicas, capacidad catalítica, vida media (incluso, entre otros, vida media en suero), capacidad para reaccionar con otras moléculas incluso, entre otros, de forma covalente o no covalente y similares. Las composiciones, incluido las proteínas que incluyen al menos un aminoácido no natural, son útiles para, incluso, entre otros, nuevos agentes terapéuticos, diagnóstico, enzimas catalíticas, enzimas industriales, proteínas de unión (incluso, entre otros, anticuerpos) e incluso, entre otros, el estudio de la estructura y la función de la proteína. Véase, p. ej., Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652.

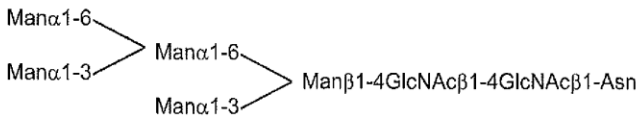
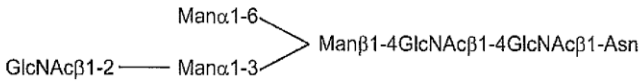
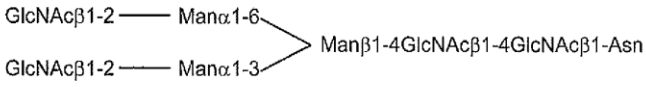
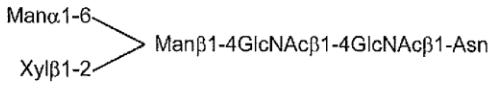
En un aspecto de la invención, una composición incluye al menos una proteína con al menos un, incluso, entre otros, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez o más aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales pueden ser los mismos o diferentes,

incluso, entre otros, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más sitios diferentes en la proteína que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más aminoácidos no naturales diferentes. En otro aspecto, una composición incluye una proteína con al menos uno, pero menos que todos, de un aminoácido particular presente en la proteína se sustituye por el aminoácido no natural. Para una proteína determinada con más de un aminoácido no natural, los aminoácidos no naturales pueden ser idénticos o diferentes (incluso, entre otros, la proteína puede incluir dos o más tipos diferentes de aminoácidos no naturales o puede incluir dos del mismo aminoácido no natural). Para una proteína determinada con más de dos aminoácidos no naturales, los aminoácidos no naturales pueden ser idénticos, diferentes o una combinación de múltiples aminoácidos no naturales del mismo tipo con al menos un aminoácido no natural diferente.

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

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

Tabla 1: Ejemplos de oligosacáridos a través de enlace GLCNAC

Tipo	Estructura base
ALTA MANOSA	
HÍBRIDO	
COMPLEJO	
XILOSA	

En otro aspecto, la modificación postraduccional incluye procesamiento proteolítico de precursores (incluso, entre otros, precursor de calcitonina, precursor de péptido relacionado con gen de calcitonina, hormona preproparatiroidea, preproinsulina, proinsulina, preproopiomelanocortina, proopiomelanocortina y similares), ensamblaje en una proteína de múltiples subunidades o ensamblaje macromolecular, traslación a otro sitio en la célula (incluso, entre otros, orgánulos, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, el núcleo, lisosomas, peroxisomas, mitocondrias, cloroplastos, vacuolas, etc., o a través de la ruta secretora). En determinadas realización, la proteína comprende una secuencia de secreción

o localización, una etiqueta de epítopos, una etiqueta FLAG, una etiqueta polihistidina, una fusión GST y similares.

Una ventaja de un aminoácido no natural es que presenta fracciones químicas adicionales que se pueden usar para añadir moléculas adicionales. Estas modificaciones se pueden realizar in vivo en una célula eucariota o no eucariota o in vitro. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la modificación postraduccional es a través del aminoácido no natural. Por ejemplo, la modificación postraduccional puede ser a través de una reacción nucleófila-electrófila. La mayoría de las reacciones utilizadas actualmente para la modificación selectiva de proteínas implican la formación de enlaces covalentes entre compañeros de reacción nucleófilos y electrófilos, incluso, entre otros, la reacción de α-halocetonas con cadenas laterales de histidina o cisteína. La selectividad en estos casos se determina por el número y la accesibilidad de las fracciones nucleófilas en la proteína. En las proteínas de la invención, se pueden utilizar otras reacciones más selectivas tales como la reacción de un cetoaminoácido no natural con hidrazidas o compuestos de aminooxi, in vitro e in vivo. Véase, p. ej., Cornish y col., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal y col., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang y col., (2001) Science 292:498-500; Chin y col., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin y col., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024;

Wang y col., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56- 61; Zhang y col., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; y Chin y col., (2003) Science, 301:964-7, los cuales se incorporan al presente por referencia. Esto permite el marcaje selectivo de prácticamente cualquier proteína con una serie de reactivos incluido fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos y moléculas citotóxicas. Véase también, la patente estadounidense N.° 6.927.042 titulada "Glycoprotein synthesis", que se incorpora al presente por referencia. Además, se pueden realizar modificaciones postraduccionales, incluso, entre otros, a través de un azido aminoácido, a través de la ligación de Staudinger (incluso, entre otros, con reactivos de triarilfosfina). Véase, p. ej., Kiick y col., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

La presente invención proporciona otro método altamente eficaz para la modificación selectiva de proteínas, que implica la incorporación genética de aminoácidos no naturales incluso, entre otros, los que contienen una fracción azida o alquinilo en proteínas en respuesta a un codón selector. Estas cadenas laterales de aminoácidos se pueden modificar después, incluso, entre otros, por una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] (véase, p. ej., Padwa, A, en Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B.

M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; y Huisgen, R. en 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, Nueva York, p. 1-176) incluso, entre otros, con derivados de alquinilo o azida, respectivamente. Como este método implica una cicloadición en lugar de una sustitución nucleófila, las proteínas se pueden modificar con selectividad extremadamente alta. Esta reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en condiciones acuosas con una excelente regioselectividad (1,4 > 1,5) mediante la adición de cantidades catalíticas de sales de Cu(I) a la mezcla de reacción. Véase, p. ej., Tornoe y col., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; y Rostovtsev y col., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599. Otro método que se puede usar es el intercambio de ligando en un compuesto biarsénico con un motivo de tetracisteína, véase, p. ej., Griffin y col., (1998) Science 281:269-272.

Una molécula que se puede añadir a una proteína de la invención a través de una cicloadición [3+2] incluye prácticamente cualquier molécula con un derivado de azida o alquinilo. Las moléculas incluyen, entre otros, colorantes, fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacáridos, polímeros (incluso, entre otros, derivados de polietilenglicol), fotorreticuladores, compuestos citotóxicos, marcadores de afinidad, derivados de biotina, resinas, perlas, una segunda proteína o polipéptido (o más),

uno o más polinucleótidos (incluso, entre otros, ADN, ARN, etc.), quelantes metálicos, cofactores, ácidos grasos, carbohidratos y similares. Estas moléculas se pueden añadir a un aminoácido no natural con un grupo alquinilo, incluso, entre otros, p-propargiloxifenilalanina o grupo azido, incluso, entre otros, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

Generación in vivo de polipéptidos de relaxina que comprenden aminoácidos codificados no naturales

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

Se describen métodos para generar ARNt y ARNt sintetasas que utilizan aminoácidos que no están codificados en sistemas de origen natural, p. ej., en las patentes estadounidenses N.° 7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan al presente por referencia. Estos métodos implican generar una maquinaria de traducción que actúa independientemente de las sintetasas y ARNt endógenos del sistema de traducción (y se denominan, por lo tanto, en ocasiones "ortogonales"). Típicamente, el sistema de traducción comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil ARNt sintetasa ortogonal (O-RS). Típicamente, la O-RS preferentemente aminoacila el O-ARNt con al menos un aminoácido no natural en el sistema de traducción y el O-ARNt reconoce al menos un codón selector

que no es reconocido por otros ARNt en el sistema. El sistema de traducción inserta de ese modo el aminoácido codificado no natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, "sustituyendo" así un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

Se han descrito diversos ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas en la técnica para insertar aminoácidos sintéticos particulares en polipéptidos, y generalmente son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, se describen O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas cetoespecíficas en Wang, L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 100:56-61 (2003) y Zhang, Z. y col., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003). Se codifican O-RS ejemplares, o partes de las mismas, por secuencias de polinucleótidos e incluyen las secuencias de aminoácidos divulgadas en las patentes estadounidenses N.° 7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan al presente por referencia. También se describen las moléculas de O-ARNt correspondientes para su uso con las O-RS en las patentes estadounidenses N.° 7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan al presente por referencia. Se describen otros ejemplos de pares O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasas en WO 2005/007870, WO 2005/007624; y WO 2005/019415.

Se describe un ejemplo de un sistema de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específico de azida en Chin, J. W. y col., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002). Las

secuencias de O-RS ejemplares para p-azido-L-Phe incluyen, entre otros, las secuencias de nucleótidos SEQ ID N.°: 14-16 y 29-32 y las secuencias de aminoácidos SEQ ID N.°: 46-48 y 61-64 como se divulga en la patente estadounidense N.° 7.083.970, que se incorpora al presente por referencia. Las secuencias de O-ARNt ejemplares adecuadas para utilizar en la presente invención incluyen, entre otros, secuencias de nucleótidos SEQ ID N.°: 1-3 como se divulga en la patente estadounidense N.° 7.083.970, que se incorpora al presente por referencia. Otros ejemplos de pares de O-ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa específicos para aminoácidos codificados no naturales particulares se describen en la patente estadounidense N.° 7.045.337, que se incorpora al presente por referencia. Se describen O-RS y O-ARNt que incorporan aminoácidos que contienen ceto y azida en S. cerevisiae en Chin, J. W. y col., Science 301:964-967(2003).

Se han presentado otros pares ortogonales. Se han descrito sistemas de glutaminilo (véase, p. ej., Liu, D. R. y Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785), aspartilo (véase, p. ej., Pastrnak, M. y col., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286) y tirosilo (véase, p. ej., Ohno, S. y col., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; y Kowal, A. K, y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) derivados de ARNt y sintetasas de S. cerevisiae para la incorporación potencial

de aminoácidos no naturales en E. coli. Se han descrito sistemas derivados de glutaminil (véase, p. ej., Kowal, A. K. y col., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273) y tirosil (véase, p. ej., Edwards, H. y Schimmel, P, (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641) sintetasas de E. coli para su uso en S. cerevisiae. El sistema de tirosilo de E. coli se ha utilizado para la incorporación de 3-yodo-L-tirosina in vivo, en células de mamífero. Véase Sakamoto, K. y col., (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699.

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

Se puede introducir uno o más codones selectores específicos en posiciones apropiadas en la secuencia que codifica el polinucleótido de relaxina empleando los métodos de mutagénesis conocidos en la técnica (incluso, entre otros, mutagénesis específica del sitio, mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción, etc.).

Se describen procedimientos para generar componentes de la maquinaria biosintética de proteínas, tales como O-RS, O-ARNt y pares O-ARNt/O-RS ortogonales que se pueden usar para incorporar un aminoácido codificado no natural en Wang, L. y col. Science 292: 498-500 (2001); Chin, J. W y col, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. y col. Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Se describen métodos y composiciones para la incorporación in vivo de aminoácidos codificados no naturales en la patente estadounidense N.° 7.045.337, que se incorpora al presente por referencia. También se describen métodos para seleccionar un par ortogonal de ARNt-ARNt sintetasa para su uso en sistema de traducción in vivo de un organismo en las patentes estadounidenses N.° 7.045.337 y 7.083.970, que se incorporan al presente por referencia. La publicación de PCT N.° WO 04/035743 titulada "Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins", que se incorpora al presente por referencia en su totalidad, describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de cetoaminoácidos. La publicación de PCT N.° WO 04/094593 titulada "Expanding the Eukaryotic Genetic Code", que se incorpora al presente por referencia en su totalidad, describe pares de RS y ARNt ortogonales para la incorporación de aminoácidos codificados no naturales en células huésped eucariotas.

Los métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (O-RS) comprenden: (a) generar una genoteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un primer organismo, incluso, entre otros, un organismo procariota, como Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, Escherichia coli, A. fulgidus, P. furiosus, P. horikoshii, A. pernix, T. thermophilus o similares, o un organismo eucariota; (b) seleccionar (o explorar) en la genoteca de RS (opcionalmente RS mutantes) miembros que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido codificado no natural y un aminoácido natural, proporcionando de este modo un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); o (c) seleccionar (opcionalmente a través de selección negativa) el grupo para RS activas (incluso, entre otros, RS mutantes) que preferentemente aminoacilan el O-ARNt en ausencia del aminoácido codificado no natural, proporcionando de este modo dicha al menos una O-RS recombinante; en la que dicha al menos una O-RS recombinante aminoacila preferentemente el O-ARNt con el aminoácido codificado no natural.

En una realización, la RS es una RS inactiva. La RS inactiva se puede generar mutando una RS activa. Por ejemplo, la RS inactiva se puede generar mutando al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos

aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6 o al menos aproximadamente 10 o más aminoácidos a aminoácidos diferentes, incluso, entre otros, alanina.

Se pueden generar genotecas de RS mutantes utilizando diversos métodos conocidas en la técnica, incluso, entre otros, el diseño racional basado en la estructura de RS tridimensional proteica o la mutagénesis de nucleótidos de RS en una técnica de diseño racional o aleatorio. Por ejemplo, las RS mutantes se pueden generar por mutaciones específicas de sitio, mutaciones aleatorias, mutaciones de recombinación que generan diversidad, construcciones quiméricas, diseño racional y por otros métodos descritos aquí o conocidos en la técnica.

En una realización, la selección (o exploración) en la genoteca de RS (opcionalmente RS mutantes) de miembros que son activos, incluso, entre otros, que aminoacilan un ARNt ortogonal (O-ARNt) en presencia de un aminoácido codificado no natural y un aminoácido natural, incluye: introducir un marcador de exploración o selección positiva, incluso, entre otros, un gen de resistencia a antibióticos, o similares, y la genoteca de RS (opcionalmente mutantes) en una serie de células, en donde el marcador de exploración o selección positiva comprende al menos un codón selector, incluso, entre otros, un codón ámbar, ocre u ópalo; cultivar la serie de

células en presencia de un agente de selección; identificar las células que sobreviven (o que muestran una respuesta específica) en presencia del agente de selección o exploración suprimiendo el o los codones selectores en el marcador de exploración o selección positiva, proporcionando así un subconjunto de células seleccionadas de forma positiva que contienen el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes). Opcionalmente, la concentración del agente de selección o exploración se puede variar.

En un aspecto, el marcador de selección positiva es un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen CAT. Opcionalmente, el marcador de selección positiva es un gen de β-lactamasa y el codón selector es un codón de parada ámbar en el gen de β-lactamasa. En otro aspecto, el marcador de exploración positiva comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad (incluso, entre otros, un marcador de superficie celular).

En una realización, la selección o exploración negativa del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que preferentemente aminoacilan el O-ARNt en ausencia del aminoácido codificado no natural incluye: introducir un marcador de exploración o selección negativa con el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) de la selección o

exploración positiva en una serie de células de un segundo organismo, en donde el marcador de exploración o selección negativa comprende al menos un codón selector (incluso, entre otros, un gen de resistencia a antibióticos, incluso, entre otros, un gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)); e identificar células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio complementado con el aminoácido codificado no natural y un agente de exploración o selección, pero que no sobreviven o no muestran la respuesta específica en un segundo medio no complementado con el aminoácido codificado no natural y el agente de selección o exploración, proporcionando así células supervivientes o células exploradas con dicha o dichas O-RS recombinantes. Por ejemplo, un protocolo de identificación de CAT opcionalmente actúa como una selección positiva o una exploración negativa en la determinación de recombinantes de O-RS apropiados. Por ejemplo, se replica opcionalmente un grupo de clones en placas de cultivo que contienen CAT (que comprende al menos un codón selector) con o sin uno o más aminoácidos codificados no naturales. Se considera, por lo tanto, que las colonias que se cultivan exclusivamente en las placas que contienen aminoácidos codificados no naturales contienen O-RS recombinante. En un aspecto, la concentración del agente de selección (o exploración) varía. En algunos aspectos, el primer y el segundo organismo son diferentes.

Por lo tanto, el primer o el segundo organismo opcionalmente comprende: un procariota, un eucariota, un mamífero, una Escherichia coli, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc. En otras realizaciones, el marcador de exploración comprende un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad.

En otra realización, la exploración o selección (incluso, entre otros, la selección negativa) del grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) incluye: aislar el grupo de RS mutantes activas de la etapa de selección positiva (b); introducir un marcador de exploración o selección negativa, en donde el marcador de exploración o selección negativa comprende al menos un codón selector (incluso, entre otros, un gen marcador tóxico, incluso, entre otros, un gen de ribonucleasa barnasa, que comprende al menos un codón selector) y el grupo de RS activas (opcionalmente mutantes) en una serie de células de un segundo organismo; e identificar las células que sobreviven o muestran una respuesta de exploración específica en un primer medio no complementado con el aminoácido codificado no natural, pero que no sobreviven o no muestran una respuesta de exploración específica en un segundo medio complementado con el aminoácido codificado no natural, proporcionando así células supervivientes o exploradas con la o las O-RS recombinantes,

en las que dicha o dichas O-RS recombinantes son específicas para el aminoácido codificado no natural. En un aspecto, el o los codones selectores comprenden aproximadamente dos o más codones selectores. Estas realizaciones pueden incluir opcionalmente aquellas en donde el o los codones selectores comprenden dos o más codones selectores y en donde el primer y el segundo organismo son diferentes (incluso, entre otros, cada organismo es opcionalmente, incluso, entre otros, un procariota, un eucariota, un mamífero, una Escherichia coli, un hongo, una levadura, una arqueobacteria, una eubacteria, una planta, un insecto, un protista, etc.). Además, en algunos aspectos el marcador de selección negativa comprende un gen de ribonucleasa barnasa (que comprende al menos un codón selector). En otros aspectos, el marcador de exploración comprende opcionalmente un marcador de exploración fluorescente o luminiscente o un marcador de exploración basado en afinidad. En las presentes realizaciones, las exploraciones o selecciones incluyen opcionalmente variación de la rigurosidad de exploración o selección.

En una realización, los métodos para producir al menos una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal recombinante (O-RS) pueden comprender además: (d) aislar la o las O-RS recombinantes; (e) generar un segundo conjunto de O-RS (opcionalmente mutadas) derivadas de la o las O-RS

recombinantes; y (f) repetir las etapas (b) y (c) hasta que se obtenga una O-RS mutada que comprende una capacidad para aminoacilar preferentemente el O-ARNt. Opcionalmente, se repiten las etapas de (d) a (f), incluso, entre otros, al menos aproximadamente dos veces. En un aspecto, el segundo conjunto de O-RS mutadas derivadas de al menos una O-RS recombinante se puede generar por mutagénesis, incluso, entre otros, mutagénesis aleatoria, mutagénesis específica de sitio, recombinación o una combinación de estas.

La rigurosidad de las etapas de selección/exploración, incluso, entre otros, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de exploración/selección positivas y negativas (b) y (c), en los métodos descritos anteriormente, opcionalmente incluye variar la rigurosidad de selección/exploración. En otra realización, la etapa de selección/exploración positiva (b), la etapa de selección/exploración negativa (c) o las etapas de selección/exploración positivas y negativas (b) y (c) comprenden usar un indicador, en donde el indicador es detectado por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o en donde el indicador es detectado por luminiscencia. Opcionalmente, el indicador se presenta en una superficie celular, en una presentación de fagos o similares y se selecciona basándose en la afinidad o la actividad

catalítica que involucra al aminoácido codificado no natural o un análogo. En una realización, la sintetasa mutada se presenta en una superficie celular, en una presentación de fagos o similares.

Los métodos para producir un ARNt ortogonal (O-ARNt) recombinante incluyen: (a) crear una genoteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt, incluso, entre otros, un ARNt supresor, de un primer organismo; (b) seleccionar (incluso, entre otros, seleccionar de forma negativa) o explorar la genoteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) a partir de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); y (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal introducida (O-RS), proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante; en donde el o los O-ARNt recombinantes reconocen un codón selector y no son reconocidos eficazmente por la RS del segundo organismo y son aminoacilados preferentemente por la O-RS. En algunas realizaciones, el o los ARNt son un ARNt supresor o comprenden un codón de tres bases único de bases naturales o no naturales, o es un codón sin sentido, un codón raro, un codón no natural, un codón que comprende al menos 4 bases, un codón ámbar, un codón ocre o un codón de parada

ópalo. En una realización, la O-ARNt recombinante posee una mejora de la ortogonalidad. Se apreciará que en algunas realizaciones, el O-ARNt se importa opcionalmente a un primer organismo desde un segundo organismo sin la necesidad de modificación. En diversas realizaciones, el primer y el segundo organismos son iguales o diferentes y se seleccionan opcionalmente, entre otros, de procariotas (incluso, entre otros, Methanococcus jannaschii, Methanobacterium, thermoautotrophicum, Escherichia coli, Halobacterium, etc.), eucariotas, mamíferos, hongos, levaduras, arqueobacterias, eubacterias, plantas, insectos, protistas, etc. Además, el ARNt recombinante se aminoacila opcionalmente por un aminoácido codificado no natural, en donde el aminoácido codificado no natural es biosintetizado in vivo de forma natural o a través de manipulación genética. Se añade opcionalmente el aminoácido codificado no natural a un medio de cultivo para al menos el primer o el segundo organismo.

En un aspecto, la selección (incluso, entre otros, la selección negativa) o la exploración de la genoteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (etapa (b)) incluye: introducir un gen de marcador tóxico, en donde el gen de marcador tóxico comprende al menos uno de los codones selectores (o un gen que conduce a la producción de un agente tóxico o estático o un gen esencial para el organismo, en

donde dicho gen marcador comprende al menos un codón selector) y la genoteca de ARNt (opcionalmente mutantes) en una serie de células del segundo organismo; y seleccionar las células supervivientes, en donde las células supervivientes contienen el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) que comprende al menos un ARNt ortogonal o un ARNt no funcional. Por ejemplo, se pueden seleccionar células supervivientes utilizando un ensayo de densidad celular de relación de comparación.

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

En una realización, la selección o exploración del grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (O-RS) introducida puede incluir: introducir un gen marcador de selección o exploración positiva, en donde el gen marcador positivo comprende un gen de resistencia a fármacos (incluso, entre otros, un gen de □-lactamasa, que comprende al menos uno de los codones selectores, como al menos un codón de parada ámbar) o un gen esencial para el organismo, o un gen que conduzca a la destoxificación de un agente tóxico, junto

con la O-RS y el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) en una serie de células del segundo organismo; e identificar las células supervivientes o exploradas que se han cultivado en presencia de un agente de selección o exploración, incluso, entre otros, un antibiótico, proporcionando así un grupo de células que poseen el o los ARNt recombinantes, en donde el o los ARNt recombinantes se aminoacilan por la O-RS e insertan un aminoácido en un producto de traducción codificado por el gen marcador positivo, en respuesta al o a los codones selectores. En otra realización, la concentración del agente de selección o exploración varía.

Se proporcionan métodos para generar pares O-ARNt/O-RS específicos. Los métodos incluyen: (a) generar una genoteca de ARNt mutantes derivados de al menos un ARNt de un primer organismo; (b) seleccionar o explorar de forma negativa la genoteca con respecto a ARNt (opcionalmente mutantes) que se aminoacilan por una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un segundo organismo en ausencia de una RS del primer organismo, proporcionando así un grupo de ARNt (opcionalmente mutantes); (c) seleccionar o explorar el grupo de ARNt (opcionalmente mutantes) con respecto a miembros que se aminoacilan por una RS ortogonal (O-RS) introducida, proporcionando así al menos un O-ARNt recombinante. El o los O-ARNt recombinantes reconocen un codón selector y no son reconocidos eficazmente por la RS del segundo organismo y se aminoacilan

preferentemente por la O-RS. El método también incluye (d) generar una genoteca de RS (opcionalmente mutantes) derivadas de al menos una aminoacil-ARNt sintetasa (RS) de un tercer organismo; (e) seleccionar o explorar la biblioteca de RS mutantes con respecto a miembros que aminoacilan preferentemente el o los O-ARNt recombinantes en presencia de un aminoácido codificado no natural y un aminoácido natural, proporcionando así un grupo de RS activas (opcionalmente mutantes); y (f) seleccionar o explorar de forma negativa el grupo con respecto a RS activas (opcionalmente mutantes) que aminoacilan preferentemente el o los O-ARNt recombinantes en ausencia del aminoácido codificado no natural, proporcionando así el o los pares de O-ARNt/O-RS específicos, en donde el o los pares de O-ARNt/O-RS específicos comprenden al menos una O-RS recombinante que es específica para el aminoácido codificado no natural y el o los O-ARNt recombinantes. Se incluyen pares de O-ARNt/O-RS específicos producidos por los métodos. Por ejemplo, el par de O-ARNt/O-RS específico puede incluir, incluso, entre otros, un par de mutARNTyr-mutTyrRS, como un par de mutARNTyr-SS12TyrRS, un par mutARNLeu-mutLeuRS, un par mutARNThr-mutThrRS, un par mutARNGlu-mutGluRS o similares. Además, se incluyen métodos en los que el primer y el tercer organismo son iguales (incluso, entre otros, Methanococcus jannaschii).

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

Los organismos de la presente invención comprenden diversos organismos y diversas combinaciones. Por ejemplo, el primer y el segundo organismos de los métodos de la presente invención pueden ser el mismo o diferentes. En una

realización, los organismos son opcionalmente un organismo procariota, incluso, entre otros, Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, Escherichia coli, A. fulgidus, P. furiosus, P. horikoshii, A. pernix, T. thermophilus o similares. Como alternativa, los organismos comprenden opcionalmente un organismo eucariota, incluso, entre otros, plantas (incluso, entre otros, plantas complejas tales como monocotiledóneas o dicotiledóneas), algas, protistas, hongos, (incluso, entre otros, levadura, etc.), animales (incluso, entre otros, mamíferos, insectos, artrópodos, etc.) o similares. En otra realización, el segundo organismo es un organismo procariota, incluso, entre otros, Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, Escherichia coli, A. fulgidus, Halobacterium, P. furiosus, P. horikoshii, A. pernix, T. thermophilus o similares. Como alternativa, el segundo organismo puede ser un organismo eucariota incluso, entre otros, una levadura, una célula animal, una célula vegetal, un hongo, una célula de mamífero o similares. En diversas realizaciones, el primer y el segundo organismo son diferentes.

Localización de aminoácidos no naturales en polipéptidos de relaxina

La presente invención contempla la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en polipéptidos de relaxina.

Se puede incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una posición particular que no interrumpe la actividad del polipéptido. Esto se puede lograr haciendo sustituciones "conservadoras" incluso, entre otros, sustituyendo aminoácidos hidrofóbicos con aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrofílicos con aminoácidos hidrofílicos o insertando el aminoácido no natural en una localización que no se requiere para la actividad.

Se pueden emplear diversos enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido codificado no natural dentro del polipéptido de insulina. Resultará evidente para los entendidos en la técnica que cualquier posición de la cadena de polipéptidos es adecuada para la selección para incorporar un aminoácido codificado no natural, y la selección puede basarse en el diseño racional o por selección aleatoria con respecto a cualquier fin deseado o ninguno en particular. La selección de sitios deseados puede ser para producir una molécula de relaxina que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluso, entre otros, agonistas, superagonistas, agonistas inversos, antagonistas, moduladores de unión al receptor, moduladores de la actividad del receptor, formación de dímeros o multímeros, sin cambios en la actividad o propiedad en comparación con la molécula

nativa o manipular cualquier propiedad física o química del polipéptido como la solubilidad, agregación o estabilidad. Por ejemplo, se pueden identificar las localizaciones en el polipéptido requeridas para la actividad biológica de los polipéptidos de relaxina utilizando análisis de mutación puntual, exploración de alanina, mutagénesis de saturación y exploración con respecto a la actividad biológica o procedimientos de exploración homólogos conocidos en la técnica. Otros métodos que se pueden utilizar para identificar residuos para la modificación de los polipéptidos de relaxina incluyen, entre otros, perfilado de secuencias (Bowie y Eisenberg, Science 253(5016): 164-70, (1991)), selecciones de genoteca de rotámeros (Dahiyat y Mayo, Protein Sci 5(5): 895-903 (1996); Dahiyat y Mayo, Science 278(5335): 82-7 (1997); Desjarlais y Handel, Protein Science 4: 2006-2018 (1995); Harbury y col, PNAS EUA 92(18): 8408-8412 (1995); Kono y col., Proteins: Structure, Function and Genetics 19: 244-255 (1994); Hellinga y Richards, PNAS EUA 91: 5803-5807 (1994)); y potenciales de pares de residuos (Jones, Protein Science 3: 567-574, (1994)) y diseño racional utilizando la tecnología Protein Design Automation®. (Véase las patentes estadounidenses N.° 6.188.965; 6.269.312; 6.403.312; WO98/47089, que se incorporan al presente por referencia). Se pueden mutar residuos que son fundamentales para la bioactividad de la relaxina, residuos que afectan la

estabilidad farmacéutica, epítopos de anticuerpos o residuos de unión al receptor. Las patentes estadounidenses N.° 5.580.723; 5.834.250; 6.013.478; 6.428.954 y 6.451.561, que se incorporan al presente por referencia, describen métodos para el análisis sistemático de la estructura y la función de polipéptidos tales como la relaxina identificando dominios activos que influyen en la actividad del polipéptido con una sustancia diana. Los residuos distintos de los identificados como fundamentales para la actividad biológica por mutagénesis de exploración de alanina u homóloga pueden ser buenos candidatos para su sustitución con un aminoácido codificado no natural dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Alternativamente, los sitios identificados como fundamentales para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para sustitución con un aminoácido codificado no natural, dependiendo de nuevo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente realizar sustituciones seriadas en cada posición en la cadena de polipéptidos con un aminoácido codificado no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Resulta fácilmente evidente para los entendidos en la técnica que cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para su uso en la presente invención.

También se pueden examinar la estructura y la actividad de los mutantes de polipéptidos de relaxina que contienen eliminaciones para determinar regiones de la proteína que son probablemente tolerantes a sustitución con un aminoácido codificado no natural. De manera similar, se pueden utilizar digestión con proteasa y anticuerpos monoclonales para identificar regiones de relaxina que son responsables de la unión con el receptor de relaxina. Una vez que se han eliminado los residuos que probablemente sean intolerantes a sustitución con aminoácidos codificados no naturales, se puede examinar el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes. Se pueden generar modelos a partir de las estructuras cristalinas tridimensionales de otros miembros de la familia de relaxina y los receptores de relaxina. El Banco de Datos de Proteínas (PDB, disponible en Internet en rcsb.org) es una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de moléculas grandes de proteínas y ácidos nucleicos. Se pueden realizar los modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no hay datos estructurales tridimensionales disponibles. Por lo tanto, los entendidos en la técnica pueden identificar fácilmente posiciones de aminoácidos que se pueden sustituir con aminoácidos codificados no naturales.

Cadena A de relaxina	accesibilidad de disolvente complejo	Interfase cadena A/B

Nombre de residuo	N.° residuo/SEQ ID N.°: 1	Residuo Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio	Residuo Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio
LEU	2	2,393927	2,336841	2,451013	0,00913	0,018259	0
TYR	3	1,05745	1,412109	0,880121	0,448218	0,164923	0,589865
SER	4	2,039557	1,726208	2,666253	0,094701	0,127334	0,029435
ALA	5	1,47603	1,32887	2,064669	0,040922	0,051152	0
LEU	6	0,520247	0,621696	0,418798	0,174242	0,189235	0,159248
ALA	7	0,476043	0,450361	0,578769	0,512186	0,474717	0,662064
ASN	8	1,252271	0,865912	1,638629	0,32958	0,460124	0,199036
LYS	9	0,886439	0,727133	1,013884	0,424786	0,531522	0,339397
CY5	10	0,307912	0,414588	0,094561	0,731348	0,802621	0,588801
CYS	11	0,791671	0,774527	0,825959	1,267628	1,170385	1,462113
HIS	12	1,644891	1,389182	1,815363	0,902367	0,910146	0,897182
VAL	13	1,432029	1,329367	1,568911	0,865782	1,041144	0,631966
GLY	14	0,721258	0,721258	0	0,814179	0,814179	0
CYS	15	0,405285	0,470822	0,274212	0,79239	0,856379	0,664412
THR	16	0,511268	0,367613	0,702808	1,096358	1,011865	1,209014
LYS	17	0,376592	0,233542	0,491032	2,691742	1,414171	3,713799
ARG	18	0,97893	0,478638	1,264811	1,626733	1,12903	1,911135
SER	19	0,416177	0,424198	0,405482	0,476934	0,49423	0,453873
LEU	20	0,155542	0,267306	0,043778	0,735924	0,711222	0,760627
ALA	21	0,478645	0,507787	0,362075	1,105314	1,045545	1,344386
ARG	22	1,273184	1,102102	1,370945	0,551495	0,572567	0,539454
PHE	23	1,054989	1,153619	0,998629	0,428106	0,829454	0,198764
CYS	24	1,352353	1,506838	1,146374	2,07439	2,22276	1,876563

Cadena B de relaxina		accesibilidad de disolvente complejo			Interfase cadena A/B		
Nombre de residuo	N.° residuo/SEQ ID N.°: 2	Residuo Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio	Residuo Promedio	Cadena principal Promedio	Cadena lateral Promedio
SER	2	2,241497	2,362674	1,999142	1,249697	1,108926	1,531239
TRP	3	1,036157	1,320435	0,922445	0,774516	1,009561	0,680498
MET	4	0,765903	0,783709	0,748097	1,378683	1,318601	1,438766
GLU	5	1,401968	1,102195	1,641786	1,60857	1,38927	1,784009
GLU	6	1,209446	0,935167	1,428869	0,994341	1,251666	0,788481
VAL	7	1,123345	1,08403	1,175766	1,917498	1,613757	2,322484
ILE	8	0,478044	0,594216	0,361873	1,329975	1,726264	0,933686
LYS	9	1,135226	0,723724	1,464427	2,332893	1,427852	3,056925
LEU	10	0,579	0,504927	0,653072	0,906043	1,195675	0,616411
CYS	11	0,862862	0,806072	0,976442	1,030881	0,795964	1,500714
GLY	12	1,089858	1,089858	0	0,604306	0,604306	0
ARG	13	3,079311	1,482092	3,992007	0,024047	0,066128	0
GLU	14	1,46883	0,992251	1,680643	0,137036	0,204496	0,107054
LEU	15	0,378917	0,508368	0,249467	0,743117	0,470105	1,016129
VAL	16	1,018006	0,820163	1,281796	0,279417	0,29034	0,264852
ARG	17	1,660023	0,937977	2,072621	0,048147	0,132403	0
ALA	18	0,51055	0,547669	0,362075	0,379088	0,387335	0,346101
GLN	19	0,436502	0,481692	0,400351	1,12185	0,733873	1,432231
ILE	20	1,321723	0,993689	1,649758	0,294635	0,473331	0,115939
ALA	21	1,001017	0,958569	1,170807	0,362917	0,40431	0,197346

ILE	22	0,381207	0,565133	0,197281	0,689578	0,665212	0,713943
CYS	23	0,888302	0,931778	0,80135	0,782559	0,685197	0,977284
GLY	24	1,608804	1,608804	0	0,25224	0,25224	0
MET	25	1,419412	1,489301	1,349524	0,239722	0,18572	0,293724
SER	26	1,07028	1,249672	0,711497	0,582382	0,433677	0,879791
THR	27	2,199516	2,265998	2,110873	0,228179	0,155968	0,32446
TRP	28	4,74167	3,651826	4,971111	0	0	0

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

Pueden ser residuos ejemplares de incorporación de un aminoácido codificado no natural los que se excluyen de regiones de unión al receptor potenciales, pueden estar completa o parcialmente expuestos al disolvente, tener interacciones de enlaces de hidrógeno mínimas o nulas con los residuos cercanos, pueden estar expuestos mínimamente a residuos reactivos cercanos, pueden estar en una o más de las caras expuestas, pueden ser un sitio o sitios que se yuxtaponen a una segunda relaxina, u otra molécula o fragmento esta, pueden estar en regiones que son altamente flexibles o estructuralmente rígidas, según se predice por la estructura tridimensional, secundaria, terciaria, o cuaternaria de relaxina, unida o no unida a su receptor, o acoplados o no acoplados a otra molécula biológicamente activa, o pueden modular la conformación de la relaxina en sí misma o dímero o multímero que comprende una o más relaxinas,

alterando la flexibilidad o rigidez de la estructura completa según se desee.

Un entendido en la técnica reconoce que dicho análisis de relaxina permite la determinación de los residuos de aminoácidos que están expuestos en la superficie en comparación con los residuos de aminoácidos que están enterrados dentro de la estructura terciaria de la proteína. Por lo tanto, es una realización de la presente invención sustituir con un aminoácido codificado no natural un aminoácido que es un residuo expuesto en la superficie.

En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID N.°: 1) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID N.°: 2).

Un examen de la estructura cristalina de la relaxina y su interacción con el receptor de relaxina puede indicar cuáles residuos de aminoácidos específicos tienen cadenas laterales que son completa o parcialmente accesibles al

disolvente. La cadena lateral de un aminoácido codificado no natural en estas posiciones puede apuntar en sentido contrario a la superficie proteica y salir hacia el disolvente.

En algunas realizaciones, el aminoácido codificado no natural en una o más de estas posiciones está unido a un polímero soluble en agua, incluso, entre otras, las posiciones: en la cadena A antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal),), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) y cualquier combinación de estos (SEQ ID N.°: 1) o en la cadena B antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 (SEQ ID N.°: 2).

Una gran diversidad de aminoácidos codificados no naturales pueden sustituir a, o incorporarse en, una posición dada en un polipéptido de relaxina. En general, se selecciona un aminoácido codificado no natural particular para la incorporación basándose en un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido de relaxina u otro miembro de la familia de relaxina o análogo de relaxina con su receptor, una preferencia por sustituciones conservadoras (es decir, aminoácidos codificados no naturales

basados en arilo, tales como p-acetilfenilalanina u O-propargiltirosina que sustituyen a Phe, Tyr o Trp) y la química de conjugación específica que se desea introducir en el polipéptido de relaxina (p. ej., la introducción de 4-azidofenilalanina si se desea efectuar una cicloadición de Huisgen [3+2] con un polímero soluble en agua que contiene una fracción alquino o la formación de un enlace amida con un polímero soluble en agua que contiene un aril éster que, a su vez, incorpora una fracción de fosfina).

En una realización, el método incluye además incorporar en la proteína el aminoácido no natural, en donde el aminoácido no natural comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto la proteína con una molécula (incluso, entre otros, un marcador, un colorante, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotorreticulador, un radionúclido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante metálico, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de spin, un

fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radiactiva, un grupo funcional nuevo, un grupo que interacciona de forma covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotoliberadora, una fracción excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo escindible químicamente, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente activo redox, un amino tioácido, una fracción tóxica, una fracción marcada de forma isotópica, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo de intercalación, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente biológicamente activo, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones o cualquier combinación de los anteriores, o cualquier otro compuesto o sustancia deseable) que comprende un segundo grupo reactivo. El primer grupo reactivo reacciona con el segundo grupo reactivo para unir la molécula al aminoácido no natural a través de una cicloadición [3+2]. En una realización, el primer grupo reactivo es una fracción alquinilo o azido y el segundo grupo reactivo es una fracción azido o alquinilo. Por ejemplo, el primer grupo reactivo es

la fracción alquinilo (incluso, entre otros, en el aminoácido no natural p-propargiloxifenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción azido. En otro ejemplo, el primer grupo reactivo es la fracción azido (incluso, entre otros, en el aminoácido no natural p-azido-L-fenilalanina) y el segundo grupo reactivo es la fracción alquinil.

En algunos casos, la o las sustituciones de aminoácidos codificados no naturales se combinarán con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido de relaxina para afectar otros rasgos biológicos del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad (incluso, entre otros, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido de relaxina o aumentar la afinidad del polipéptido de relaxina por su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden potenciar la actividad antiviral del polipéptido de relaxina. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad (incluso, entre otros, cuando se expresa en E. coli u otras células huésped) del polipéptido de relaxina. En algunas realizaciones, las adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la

solubilidad del polipéptido de relaxina después de expresión en E. coli u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los sitios se seleccionan para sustitución con un aminoácido no natural o codificado no natural además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado un aumento de la solubilidad del polipéptido después de la expresión en E. coli u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad por el receptor del polipéptido de relaxina, proteínas de unión o ligando asociado, modula la transducción de señales después de la unión con el receptor de relaxina, modula la vida media en circulación, modula la liberación o la biodisponibilidad, facilita la purificación o mejora o altera una vía particular de administración. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina comprenden una adición, sustitución o eliminación que aumenta la afinidad de la variante de relaxina por su receptor. De igual modo, los polipéptidos de relaxina pueden comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpo (incluso, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluso, entre otros, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluso, entre otros, biotina) que mejoran la detección

(incluso, entre otros, GFP), la purificación, el transporte a través de tejidos o membranas celulares, la liberación o activación de profármacos, la reducción del tamaño de relaxina u otros rasgos del polipéptido.

En algunas realizaciones, la sustitución de un aminoácido codificado no natural genera un antagonista de relaxina. En algunas realizaciones, se sustituye o añade un aminoácido codificado no natural en una región implicada en la unión con el receptor. En algunas realizaciones, los antagonistas de la relaxina comprenden al menos una sustitución que provoca que la relaxina actúe como un antagonista. En algunas realizaciones, el antagonista de relaxina comprende un aminoácido codificado no natural unido a un polímero soluble en agua que está presente en una región de unión al receptor de la molécula de relaxina.

En algunos casos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos se sustituyen por uno o más aminoácidos codificados no naturales. En algunos casos, el polipéptido de relaxina incluye además 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de uno o más aminoácidos codificados no naturales por aminoácidos naturales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, uno o más residuos en la relaxina se sustituyen por uno o más aminoácidos codificados no naturales. En algunos casos, el o los residuos codificados no naturales se unen a uno o más PEG lineales o ramificados de

peso molecular más bajo, potenciando así la afinidad de unión y la vida media en suero comparable con respecto a las especies unidas a un solo PEG de mayor peso molecular.

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

Expresión en no eucariotas y eucariotas

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

Los sistemas de expresión bacterianos para expresar polipéptidos de relaxina de la invención están disponibles, incluso, entre otros, en E. coli, Bacillus sp., Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida y Salmonella (Palva y col., Gene 22:229-235 (1983); Mosbach y col., Nature 302:543-545 (1983)) En el mercado, hay kits disponibles para estos sistemas de expresión. Los sistemas de

expresión eucariotas para células de mamífero, levadura y células de insecto son conocidos por los entendidos en la técnica y también están disponibles en el mercado. En los casos en los que se utilizan ARNt ortogonales y aminoacil ARNt sintetasas (descritos anteriormente) para expresar los polipéptidos de relaxina de la invención, se seleccionan las células huésped para expresión basándose en su capacidad para usar los componentes ortogonales. Las células huésped ejemplares incluyen bacterias Gram-positivas (incluso, entre otros, B. brevis, B. subtilis o Streptomyces) y bacterias Gram-negativas (E. coli, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida), así como levadura y otras células eucariotas. Las células que comprenden pares de O-ARNt/O-RS se pueden utilizar como se describe aquí.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad de sintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. En un aspecto, la composición incluye opcionalmente, incluso, entre otros, al menos 10 microgramos, al menos 50 microgramos, al menos 75 microgramos, al menos 100 microgramos, al menos 200 microgramos, al menos 250 microgramos, al menos 500 microgramos, al menos 1 miligramo, al menos 10 miligramos, al menos 100 miligramos, al menos un gramo o más de la proteína que comprende un aminoácido no natural, o una cantidad que se

puede obtener con métodos de producción de proteínas in vivo (en el presente documento se proporcionan detalles sobre la producción y purificación de proteínas recombinantes). En otro aspecto, la proteína está opcionalmente presente en la composición a una concentración de, incluso, entre otros, al menos 10 microgramos de proteína por litro, al menos 50 microgramos de proteína por litro, al menos 75 microgramos de proteína por litro, al menos 100 microgramos de proteína por litro, al menos 200 microgramos de proteína por litro, al menos 250 microgramos de proteína por litro, al menos 500 microgramos de proteína por litro, al menos 1 miligramo de proteína por litro o al menos 10 miligramos de proteína por litro o más, incluso, entre otros, en un lisado celular, un tampón, un tampón farmacéutico u otra suspensión líquida (incluso, entre otros, en un volumen de, incluso, entre otros, cualquiera de aproximadamente 1 nl a aproximadamente 100 L o más). La producción de grandes cantidades (incluso, entre otros, mayores que las típicamente posibles con otros métodos, incluso, entre otros, traducción in vitro) de una proteína en una célula eucariota que incluye al menos un aminoácido no natural es una característica de la invención.

Una célula huésped eucariota o célula huésped no eucariota de la presente invención proporciona la capacidad de biosintetizar proteínas que comprenden aminoácidos no naturales en grandes cantidades útiles. Por ejemplo, se

pueden producir proteínas que comprenden un aminoácido no natural a una concentración de, incluso, entre otros, al menos 10 µ/litro, al menos 50 µ/litro, al menos 75 µ/litro, al menos 100 µ/litro, al menos 200 µ/litro, al menos 250 µ/litro o al menos 500 µ/litro, al menos 1 mg/litro, al menos 2 mg/litro, al menos 3 mg/litro, al menos 4 mg/litro, al menos 5 mg/litro, al menos 6 mg/litro, al menos 7 mg/litro, al menos 8 mg/litro, al menos 9 mg/litro, al menos 10 mg/litro, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/litro, 1 g/litro, 5 g/litro, 10 g/litro o más de proteína en un extracto celular, lisado celular, medio de cultivo, tampón o similares.

En el mercado, hay varios vectores adecuados para la expresión de la relaxina disponibles. Los vectores de expresión útiles para los huéspedes eucariotas, incluyen, entre otros, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Estos vectores incluyen pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) y pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., USA), plásmidos bacterianos, como plásmidos de E. coli, incluso pBR322, pET3a y pET12a, plásmidos de intervalo de huésped más amplio, como RP4, ADN de fago, p. ej., los diversos derivados de fago lambda, p. ej., NM989 y otros ADN de fago, como M13 y ADN de fago de cadena única

filamentosos se pueden utilizar. Se pueden utilizar el plásmido 2µ y sus derivados, el vector POT1 (patente estadounidense N.° 4.931.373 que se incorpora al presente por referencia), el vector pJSO37 descrito en (Okkels, Ann. New York Aced. Sci. 782, 202 207, 1996) y pPICZ A, B o C (Invitrogen) con células huésped de levadura. Para las células de insecto, los vectores incluyen, entre otros, pVL941, pBG311 (Cate y col., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685 98 (1986), pBluebac 4.5 y pMelbac (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina también puede incluir, o no, una secuencia que codifica un péptido señal. El péptido señal está presente cuando el polipéptido va a ser secretado de las células en las cuales se expresa. Dicho péptido señal puede ser cualquier secuencia. El péptido señal puede ser procariota o eucariota. Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89 104) describe un péptido señal para usar en células de mamífero (péptido señal de cadena ligera kappa de Ig murina). Otros péptidos señal incluyen, entre otros, el péptido señal factor α de S. cerevisiae (patente estadounidense N.° 4.870.008, que se incorpora al presente por referencia), el péptido señal de amilasa salival de ratón (O. Hagenbuchle y col., Nature 289, 1981, pp. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa

modificada (L. A. Valls y col., Cell 48, 1987, pp. 887-897), el péptido señal BAR1 de levadura (WO 87/02670, que se incorpora al presente por referencia) y péptido señal de proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani y col., Yeast 6,1990, pp. 127-137).

Los ejemplos de células huésped mamíferas adecuadas son conocidos por los entendidos en la técnica. Estas células huésped pueden ser células ováricas de hámster chino (CHO), (p. ej. CHO-K1; ATCC CCL-61), células de mono verde (COS) (p. ej. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de ratón (p. ej. NS/O), líneas celulares de riñón de hámster bebé (BHK) (p. ej. ATCC CRL-1632 o ATCC CCL-10) y células humanas (p. ej. HEK 293 (ATCC CRL-1573)), así como células vegetales en cultivo tisular. Estas líneas celulares y otras están disponibles en depósitos públicos como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Para proporcionar una glicosilación mejorada del polipéptido de relaxina, se puede modificar una célula huésped mamífera para expresar sialiltransferasa, p. ej. 1,6-sialiltransferasa, p. ej. como se describe en la patente estadounidense N.° 5.047.335, que se incorpora al presente por referencia.

Los métodos para la introducción de ADN exógeno en células huésped mamíferas incluyen, entre otros, transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposoma,

vectores virales y los métodos de transfección descritos por Life Technologies Ltd, Paisley, RU utilizando Lipofectamin 2000 y Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA utilizando FuGENE 6. Estos métodos son conocidos en la técnica y fueron descritos por Ausbel y col. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. El cultivo de células mamíferas se puede realizar de acuerdo con los métodos establecidos, p. ej. como se divulga en (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, editado por Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA y Harrison Mass. y Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997).

Sistemas de expresión, cultivo y aislamiento

Se pueden expresar los polipéptidos de relaxina en diversos sistemas de expresión adecuados incluso, p. ej., levadura, células de insecto, células de mamífero y bacterias. Se proporciona a continuación una descripción de los sistemas de expresión ejemplares.

Levadura. Según se emplea aquí, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras capaces de expresar un gen que codifica un polipéptido de relaxina. Estas levaduras incluyen, entre otros, levaduras ascosporógenas (Endomycetales), levaduras basidiosporógenas y levaduras que pertenecen al grupo de hongos imperfectos (Blastomycetes). Las levaduras ascosporógenas se dividen en

dos familias, Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. La segunda comprende cuatro subfamilias, Schizosaccharomycoideae (p. ej., género Schizosaccharomyces), Nadsonioideae, Lipomycoideae y Saccharomycoideae (p. ej., géneros Pichia, Kluyveromyces y Saccharomyces). Las levaduras basidiosporógenas incluyen los géneros Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus, Filobasidium y Filobasidiella. Las levaduras que pertenecen al grupo de los hongos imperfectos (Blastomycetes) se dividen en dos familias, Sporobolomycetaceae (p. ej., géneros Sporobolomyces y Bullera) y Cryptococcaceae (p. ej., género Candida).

Son de particular interés para el uso con la presente invención las especies dentro de los géneros Pichia, Kluyveromyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Hansenula, Torulopsis y Candida, incluso, entre otros, P. pastoris, P. guillerimondii, S. cerevisiae, S. carlsbergensis, S. diastaticus, S. douglasii, S. kluyveri, S. norbensis, S. oviformis, K. lactis, K. fragilis, C. albicans, C. maltosa y H. polymorpha.

La selección de una levadura adecuada para la expresión de polipéptidos de relaxina está dentro de la competencia de los entendidos en la técnica. Al seleccionar huéspedes de levadura para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que se ha demostrado que tienen, p. ej., buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, buena

capacidad de secreción, buena producción de proteína soluble y resistencia global. Las levaduras están disponibles en general en diversas fuentes, incluso, entre otros, el Centro de Estirpes Genéticas de Levadura, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

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

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, incluido replicones extracromosómicos o vectores de integración, para la transformación en muchos

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

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

promotores adecuados para el uso en la expresión de levaduras en EP 0 073 657.

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

Otros elementos de control que pueden comprender parte de los vectores de expresión de levadura incluyen terminadores, p. ej., de GAPDH o los genes de enolasa

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

Los métodos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura son conocidos por los entendidos en la técnica y típicamente incluyen, entre otros, la transformación de esferoplastos o de células huésped de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Por ejemplo, la transformación de levadura se puede llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en Hsiao y col., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 y Van Solingen y col., J. BACT, (1977) 130:946. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como por inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplastos como se describe en general en SAMBROOK y col., MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001). Las células huésped de levadura después

se pueden cultivar utilizando las técnicas convencionales conocidas por los entendidos en la técnica.

Otros métodos para expresar proteínas heterólogas en células huésped de levadura son conocidos por los entendidos en la técnica. Véase, en general, la publicación de patente estadounidense N.° 20020055169, las patentes estadounidenses N.° 6.361.969; 6.312.923; 6.183.985; 6.083.723; 6.017.731; 5.674.706; 5.629.203; 5.602.034; y 5.089.398; las patentes reexaminadas estadounidenses N.° RE37.343 y RE35.749; las solicitudes de patente publicadas de PCT WO 99/07862; WO 98/37208; y WO 98/26080; las solicitudes de patente europeas EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; y EP 0 164 556. Véase además Gellissen y col., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos y col., YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7, que se incorporan al presente por referencia.

Las cepas huésped de levadura se pueden cultivar en fermentadores durante la etapa de amplificación utilizando métodos de fermentación semicontinuos convencionales conocidos por los entendidos en la técnica. Los métodos de fermentación se pueden adaptar para responder a las diferencias en la ruta de utilización de carbono de un huésped de levadura particular o modo de control de la expresión. Por ejemplo, la fermentación de un huésped de

levadura de Saccharomyces puede requerir un único suministro de glucosa, una fuente de nitrógeno compleja (p. ej., hidrolisados de caseína) y complementación con múltiples vitaminas. Por el contrario, la levadura metilotrófica P. pastoris puede requerir suministros de glicerol, metanol y pequeñas cantidades de minerales, pero solo sales de amonio sencillas (nitrógeno) para un cultivo y expresión óptimos. Véase, p. ej., la patente estadounidense N.° 5.324.639; Elliott y col., J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; y Fieschko y col., BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113, que se incorporan al presente por referencia.

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

Células de insecto infectadas por baculovirus. El término "huésped de insecto" o "célula huésped de insecto" se refiere a un insecto que se puede utilizar, o se ha utilizado, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. El término incluye la descendencia de la célula huésped de insecto original que se ha transfectado. Se entiende que la descendencia de una sola célula parenteral puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es lo suficientemente similar a la parental para caracterizarse por la propiedad relevante, como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina, se incluye en la descendencia pretendida por esta definición. La expresión de baculovirus de los polipéptidos de relaxina resulta útil en la presente invención y el uso de tecnología de ADNr, sus polipéptidos o precursores porque la relaxina puede ser biosintetizada en cualquier cantidad de células huésped incluido bacterias, células de mamífero, células de insecto, levadura u hongos. Una realización de la presente invención incluye la biosíntesis de la relaxina, relaxina modificada, polipéptidos de relaxina o análogos de relaxina en bacterias, levadura o células de mamífero. Otra realización de la presente invención comprende la biosíntesis

realizada en E. coli o una levadura. Ejemplos de biosíntesis en células de mamífero y animales transgénicos se describen en Hakola, K. [Molecular and Cellular Endocrinology, 127:59-69,(1997)].

La selección de células de insecto adecuadas para la expresión de polipéptidos de relaxina es conocida por los entendidos en la técnica. En la técnica, se han descrito detalladamente varias especies de insectos y están disponibles en el mercado incluido *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. Al seleccionar huéspedes de insectos para la expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que han demostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica y resistencia global. Los insectos están disponibles en general en diversas fuentes, incluso, entre otros, el Centro de Estirpes Genéticas de Insectos, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA).

En general, los componentes de un sistema de expresión de insectos infectados por baculovirus incluyen un vector de transferencia, generalmente un plásmido bacteriano, que contiene un fragmento del genoma de baculovirus y un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen heterólogo que se expresará; un baculovirus natural con secuencias

homólogas al fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto posibilita la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma de baculovirus); y células huésped de insecto y medios de cultivo adecuados. Los materiales, métodos y técnicas utilizados en la construcción de vectores, transfección de células, selección de placas, crecimiento de células en cultivo y similares son conocidas en la técnica y hay manuales disponibles que describen estas técnicas.

Después de insertar el gen heterólogo en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral natural se transfectan a una célula huésped de insecto en donde el vector y el genoma viral se recombinan. El virus recombinante empaquetado se expresa y se identifican y purifican placas recombinantes. Están disponibles en el mercado los materiales y los métodos para los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus en forma de kit, p. ej., de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Estas técnicas en general son conocidas por los entendidos en la técnica y se describen completamente en SUMMERS Y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN N.° 1555 (1987). Véase además, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING y POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); y O'REILLY y

col., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

De hecho, la producción de diversas proteínas heterólogas utilizando sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus es conocida por los entendidos en la técnica. Véanse, p. ej., las patentes estadounidenses N.° 6.368.825; 6.342.216; 6.338.846; 6.261.805; 6.245.528; 6.225.060; 6.183.987; 6.168.932; 6.126.944; 6.096.304; 6.013.433; 5.965.393; 5.939.285; 5.891.676; 5.871.986; 5.861.279; 5.858.368; 5.843.733; 5.762.939; 5.753.220; 5.605.827; 5.583.023; 5.571.709; 5.516.657; 5.290.686; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082, que se incorporan al presente por referencia.

Se conocen en la técnica vectores que son útiles en los sistemas de expresión de células de insecto/baculovirus e incluyen, p. ej., vectores de transferencia y expresión en insectos derivados del baculovirus virus de la polihedrosis nuclear de Autographacalifornica (AcNPV), que es un vector de expresión viral independiente de auxiliar. Los vectores de expresión virales derivados de este sistema generalmente

utilizan el promotor del gen de polihedrina viral fuerte para dirigir la expresión de genes heterólogos. Véase en general, O'Reilly y col., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Antes de insertar el gen ajeno en el genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente que comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia codificante de interés y secuencia de terminación de la transcripción, típicamente se ensamblan en una construcción de sustitución intermedia (vector de transferencia). Las construcciones de sustitución intermedias se mantienen con frecuencia en un replicón, por ejemplo, un elemento cromosómico extra (p. ej., plásmidos) capaz de establecer el mantenimiento en un huésped, por ejemplo, bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un huésped adecuado para la clonación y amplificación. Más específicamente, el plásmido puede contener la señal de poliadenilación de polihedrina (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) y un gen de resistencia a ampicilina procariota (amp) y un origen de replicación para la selección y la propagación en E. coli.

Un vector de transferencia utilizado generalmente para introducir genes ajenos en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los entendidos en la técnica, incluido, p. ej., pVL985, que altera el codón

de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo desde el ATT. Véase Luckow y Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Otros vectores disponibles en el mercado incluyen, p. ej., PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Después de la inserción del gen heterólogo, el vector de transferencia y el genoma de baculovirus natural se cotransfectan en una célula huésped de insecto. En la técnica, se conocen los métodos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus. Véase SUMMERS y SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith y col., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow y Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen como el gen de la polihedrina, por recombinación de cruce doble homólogo; la inserción también puede ser en un sitio de enzima de restricción introducido por ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Véase Miller y col., BIOESSAYS (1989) 11(4):91.

La transfección se puede realizar por electroporación. Véase TROTTER y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Alternativamente, se pueden utilizar liposomas para transfectar las células de insecto con el vector de expresión recombinante y el

baculovirus. Véase, p. ej., Liebman y col., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves y col., BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050; Nomura y col., J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570; Schmidt y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert y col., NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS y col., CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai y col., PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin y col., NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost y col., GENE (1997) 190:139; Jakobsson y col., J. BIOL, CHEM. (1996) 271:22203; Rowles y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey y col., J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley y col., J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk y col., J. VIROL. (1994) 68(2):766; y Peng y col., BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Los liposomas disponibles en el mercado incluyen, p. ej., Cellfectin® y Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Además, se puede utilizar transfección de fosfato de calcio. Véase TROTTER y WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; y Mann y King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.

Los vectores de expresión de baculovirus generalmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción cadena abajo (3’) de una secuencia codificante (p. ej., gen

estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que generalmente se sitúa próxima al extremo 5’ de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción típicamente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de baculovirus también puede tener un segundo dominio llamado potenciador que, si está presente, generalmente está distante del gen estructural. Además, la expresión puede ser regulada o constitutiva.

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

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

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

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

E. Coli, especies de Pseudomonas y otros procariotas.

Las técnicas de expresión bacteriana son conocidas por los entendidos en la técnica. Hay una gran diversidad de vectores disponibles para utilizar en huéspedes bacterianos. Los

vectores pueden ser vectores de copia única o de una multiplicidad alta o baja de copias. Los vectores pueden servir para clonación o expresión. En vista de la extensa bibliografía con respecto a los vectores, la disponibilidad comercial de muchos vectores e incluso manuales que describen vectores y sus características y mapas de restricción, no se requiere un análisis exhaustivo en el presente. Como se sabe, los vectores normalmente implican marcadores que posibilitan la selección, pudiendo proporcionar dichos marcadores resistencia a agentes citotóxicos, prototrofia o inmunidad. Con frecuencia, hay diversos marcadores presentes que proporcionan diferentes características.

Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (p. ej., gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que generalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción típicamente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado operador, que se puede solapar con un sitio de unión a ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada (inducible) negativa, ya que una proteína represora

génica se puede unir al operador e inhibir así la transcripción de un gen específico. Se puede producir expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, como el operador. Además, se puede lograr una regulación positiva por una secuencia de unión a la proteína activadora génica que, si está presente, está habitualmente próxima (5') a la secuencia de unión a la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora génica es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en Escherichia coli (E. coli) [Raibaud y col., ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Por lo tanto, la expresión regulada puede ser positiva o negativa y potenciar o reducir así la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras especialmente útiles. Los ejemplos incluyen las secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col., NATURE (1977) 198:1056] y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas como triptófano (trp) [Goeddel y col., NUC, ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton y col., NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; la patente estadounidense N.° 4.738.921; las publicaciones de EP N.° 036 776 y 121 775, que se incorporan al presente por referencia]. El sistema promotor de β-galactosidasa (bla) [Weissmann

(1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake y col., NATURE (1981) 292:128] y T5 [patente estadounidense N.° 4.689.406, que se incorporan al presente por referencia] también proporcionan secuencias promotoras útiles. Los métodos preferidos de la presente invención utilizan promotores fuertes, como el promotor de T7 para inducir polipéptidos de relaxina a niveles altos. Los ejemplos de estos vectores son conocidos por los entendidos en la técnica e incluyen la serie pET29 de Novagen y los vectores pPOP descritos en WO 99/05297, que se incorpora al presente por referencia. Estos sistemas de expresión producen niveles altos de polipéptidos de relaxina en el huésped sin afectar la viabilidad de la célula huésped o sus parámetros de crecimiento. pET19 (Novagen) es otro vector conocido en la técnica.

Además, también actúan como promotores bacterianos los promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden unir secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago con las secuencias de los operones de otros promotores bacterianos o bacteriófagos, creando un promotor híbrido sintético [patente estadounidense N.° 4.551.433, que se incorpora al presente por referencia]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac comprendido por

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

Además de una secuencia promotora operativa, un sitio de unión a ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes ajenos en procariotas. En E. coli, el sitio de unión a ribosoma se denomina la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio [Shine y col., NATURE (1975) 254:34]. Se cree que la secuencia SD promueve la unión de ARNm al ribosoma por el emparejamiento de bases entre la

secuencia SD y el extremo 3’ de ARNr 16S de E. coli [Steitz y col. “Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA”, en Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariotas con sitios de unión a ribosoma débil [Sambrook y col. “Expression of cloned genes in Escherichia coli”, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

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

La selección de bacterias huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos de relaxina es conocida por los

entendidos en la técnica. Al seleccionar huéspedes bacterianos para expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir los que se ha demostrado que tienen, entre otros, buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, baja actividad proteolítica y resistencia global. Los huéspedes bacterianos están disponibles en general en diversas fuentes, incluso, entre otros, el Centro de Estirpes Bacterianas, Departamento de Biofísica y Física Médica, Universidad de California (Berkeley, CA) y la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") (Manassas, VA). La fermentación industrial/farmacéutica generalmente utiliza bacterias derivadas de cepas K (p. ej., W3110) o de bacterias derivadas de cepas B (p. ej., BL21) Estas cepas son particularmente útiles debido a que sus parámetros de crecimiento se conocen extremadamente bien y son resistentes. Además, estas cepas no son patógenas, lo que es importante comercialmente por razones de seguridad y ambientales. Otros ejemplos de huéspedes E. coli adecuados incluyen, entre otros, cepas de BL21, DH10B o derivados de las mismas. En otra realización de los métodos de la presente invención, el huésped de E. coli es una cepa proteasa menos que incluye, entre otros, OMP- y LON- La cepa de célula huésped puede ser una especie de Pseudomonas, incluso, entre otros, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida. Se sabe que Pseudomonas fluorescens biovar 1, cepa MB101 designada, es

útil para producción recombinante y está disponible para procesos de producción de proteínas terapéuticos. Ejemplos de un sistema de expresión de Pseudomonas incluyen el sistema disponible de The Dow Chemical Company como una cepa huésped (Midland, MI disponible en línea en dow.com).

Una vez que se ha establecido una cepa de célula huésped recombinante (es decir, la construcción de expresión se ha introducido en la célula huésped y se aíslan células huésped con la construcción de expresión apropiada), la cepa de célula huésped recombinante se cultiva en condiciones apropiadas para la producción de polipéptidos de relaxina. Como resultará evidente para un entendido en la técnica, el método de cultivo de la cepa de célula huésped recombinante dependerá de la naturaleza de la construcción de expresión utilizada y de la identidad de la célula huésped. Las cepas huésped recombinantes normalmente se cultivan utilizando métodos que se conocen por los entendidos en la técnica. Las células huésped recombinantes típicamente se cultivan en medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas y, opcionalmente, que contiene vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y otros suplementos de cultivo proteínicos conocidos por los entendidos en la técnica. El medio líquido para cultivo de células huésped puede contener opcionalmente antibióticos o antifúngicos para evitar el crecimiento de microorganismos no

deseables o compuestos incluso, entre otros, antibióticos para seleccionar células huésped que contienen el vector de expresión.

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

Los polipéptidos de relaxina de la presente invención normalmente se purifican después de expresión en sistemas recombinantes. El polipéptido de relaxina se puede purificar a partir de células huésped o medio de cultivo a través de diversos métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos de relaxina producidos en células huésped bacterianas pueden ser poco solubles o insolubles (en forma de cuerpos de inclusión). En una realización de la presente invención, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos fácilmente en el polipéptido de relaxina que se seleccionan para el fin de aumentar la solubilidad de la proteína producida de forma recombinante utilizando los métodos divulgados en el presente así como los conocidos en la técnica. En el caso de proteína insoluble, se puede recolectar la proteína de lisados de células huésped mediante centrifugación y se pueden seguir

adicionalmente por homogeneización de las células. En el caso de proteína poco soluble, se pueden añadir compuestos que incluyen, entre otros, polietilenimina (PEI) para inducir la precipitación de proteína parcialmente soluble. Después se puede recolectar la proteína precipitada convenientemente por centrifugación. Se pueden romper u homogenizar células huésped recombinantes para liberar los cuerpos de inclusión desde el interior de las células utilizando diversos métodos conocidos por los entendidos en la técnica. La rotura u homogeneización de las células huésped se puede realizar utilizando técnicas conocidas incluso, entre otros, rotura enzimática de células, sonicación, homogeneización suave o rotura de liberación a alta presión. En una realización del método de la presente invención, se utiliza la técnica de liberación a alta presión para romper las células huésped de E. coli para liberar los cuerpos de inclusión de los polipéptidos de relaxina. Cuando se manipulan cuerpos de inclusión del polipéptido de relaxina, puede ser ventajoso minimizar el tiempo de homogeneización en repeticiones para maximizar la producción de cuerpos de inclusión sin pérdida debido a factores como solubilización, cizallamiento mecánico o proteólisis.

El polipéptido de relaxina insoluble o precipitado después se puede solubilizar utilizando cualquiera de varios agentes de solubilización adecuados conocidos en la técnica.

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

En el caso de proteína de relaxina soluble, la relaxina se puede secretar en el espacio periplásmico o en el medio de

cultivo. Además, la relaxina soluble puede estar presente en el citoplasma de las células huésped. Puede ser deseable concentrar relaxina soluble antes de realizar las etapas de purificación. Se pueden utilizar las técnicas estándar conocidas por los entendidos en la técnica para concentrar relaxina soluble a partir de, por ejemplo, lisados celulares o medio de cultivo. Además, se pueden utilizar las técnicas estándar conocidas por los entendidos en la técnica para romper células huésped y liberar relaxina soluble del citoplasma o espacio periplásmico de las células huésped.

Cuando se produce el polipéptido de relaxina como una proteína de fusión, se puede retirar la secuencia de fusión. Se puede lograr le eliminación de una secuencia de fusión por escisión enzimática o química. La eliminación enzimática de secuencias de fusión se puede lograr utilizando métodos conocidos por los entendidos en la técnica. La selección de enzima para la eliminación de la secuencia de fusión se determinará mediante la identidad de la fusión y las condiciones de reacción se especificarán mediante la secreción de enzima como resultará evidente para un entendido en la técnica. La escisión química se puede lograr utilizando reactivos conocidos por los entendidos en la técnica, incluso, entre otros, bromuro de cianógeno, TEV proteasa y otros reactivos. El polipéptido de relaxina escindido se puede purificar a partir de la secuencia de fusión escindida

a través de métodos conocidos por los entendidos en la técnica. Dichos métodos se determinarán por la identidad y las propiedades de la secuencia de fusión y el polipéptido de relaxina, como resultará evidente para un entendido en la materia. Los métodos para la purificación pueden incluir, entre otros, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico o diálisis o cualquier combinación de estos.

El polipéptido de relaxina también se puede purificar para retirar ADN de la solución de proteína. Se puede retirar ADN a través de cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo precipitación o cromatografía de intercambio iónico, pero se puede retirar por precipitación con un agente precipitante de ácido nucleico, por ejemplo, entre otros, sulfato de protamina. El polipéptido de relaxina se puede separar del ADN precipitado utilizando métodos conocidos estándar incluso, entre otros, centrifugación o filtración. La eliminación de moléculas de ácido nucleico del huésped es un factor importante en una situación en la que el polipéptido de relaxina se va a utilizar para tratar seres humanos y los métodos de la presente invención reducen el ADN de la célula huésped a niveles farmacéuticamente aceptables.

También se pueden utilizar métodos para la fermentación a pequeña escala o a gran escala en expresión proteica,

incluso, entre otros, fermentadores, matraces de agitación, biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, sistemas de cultivos de frascos rotatorios y sistemas de biorreactores de tanque con agitación. Cada uno de estos métodos se puede realizar en un proceso de modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

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

Cualquiera de los siguientes métodos ejemplares se puede emplear para la purificación de polipéptidos de relaxina de la invención: cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (utilizando, incluso, entre otros, DEAE SEPHAROSE); cromatografía en sílice; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); HPLC de fase inversa; filtración en gel (utilizando, incluso, entre otros, SEPHADEX G-75);

cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de quelato metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluso, entre otros, centrado isoeléctrico preparatorio), solubilidad diferencial (incluso, entre otros, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

Las proteínas de la presente invención, incluso, entre otros, proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, péptidos que comprenden aminoácidos no naturales, anticuerpos para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, compañeros de unión para proteínas que comprenden aminoácidos no naturales, etc., se pueden purificar, parcial o sustancialmente hasta homogeneidad, de acuerdo con métodos estándar conocidos y utilizados por los entendidos en la técnica. En consecuencia, se pueden recuperar polipéptidos de la invención y purificar a través de cualquiera de varios métodos conocidos por los entendidos en la técnica, incluso, entre otros, precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido o base, cromatografía en columna, cromatografía en columna de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía del fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina,

electroforesis en gel y similares. Se pueden utilizar etapas de replegamiento de proteínas, según se desee, al preparar proteínas maduras correctamente plegadas. Se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de afinidad u otros métodos adecuados en etapas de purificación final en las que se desea alta pureza. En una realización, se utilizan anticuerpos preparados contra aminoácidos no naturales (o proteínas o péptidos que comprenden aminoácidos no naturales) como reactivos de purificación, incluso, entre otros, purificación basada en afinidad de proteínas o péptidos que comprenden uno o más aminoácidos no naturales. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad, según se desee, los polipéptidos se usan opcionalmente para diversas utilidades, incluso, entre otros, como componentes de ensayo, agentes terapéuticos, profilaxis, diagnóstico, reactivos de investigación o como inmunógenos para producción de anticuerpos. Se pueden obtener anticuerpos generados contra polipéptidos de la presente invención administrando los polipéptidos o fragmentos que portan epítopos o células a un animal, preferentemente a una animal no humano, usando protocolos rutinarios. Un entendido en la técnica podría generar anticuerpos utilizando diversas técnicas conocidas. Además, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, incluso otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos

anteriormente descritos se pueden emplear para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos. También se pueden emplear anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención para tratar enfermedades.

También se pueden utilizar polipéptidos de la presente invención y polinucleótidos descritos en el presente como vacunas. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero que comprende inocular al mamífero un polipéptido de la presente invención, adecuado para producir respuesta inmune de linfocitos T o anticuerpos, incluso, por ejemplo, linfocitos T que producen citocinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho animal de enfermedad, si la enfermedad ya está establecida dentro del individuo o no. También se puede inducir una respuesta inmunológica en un mamífero a través de un método que comprende suministrar un polipéptido de la presente invención mediante un vector que dirige la expresión del polinucleótido y codificar el polipéptido in vivo para inducir una respuesta inmunológica tal para producir anticuerpo para proteger dicho animal de enfermedades de la invención. Una forma de administrar al vector es acelerándolo en las células deseadas como un recubrimiento en partículas o de otro modo. Dicho vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, un ácido

nucleico modificado o un híbrido de ADN/ARN. Para su uso como una vacuna, se proporcionará normalmente un polipéptido o un vector de ácido nucleico como una formulación de vacuna (composición). La formulación puede comprender adicionalmente un portador adecuado. Debido a que un polipéptido se puede descomponer en el estómago, éste se puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. La formulación de vacuna también puede incluir sistemas adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación que se conocen por los entendidos en la técnica. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y se puede determinar fácilmente por experimentación rutinaria.

Expresión en sistemas alternativos

Se han empleado varias estrategias para introducir aminoácidos no naturales en proteínas en células huésped no recombinantes, células huésped mutagenizadas o en sistemas sin células. Estos sistemas son adecuados para su uso en la

preparación de polipéptidos de relaxina de la presente invención. La derivatización de aminoácidos con cadenas laterales reactivas, por ejemplo Lys, Cys y Tyr dio como resultado la conversión de lisina a N^2-acetil-lisina. La síntesis química también proporciona un método sencillo para incorporar aminoácidos no naturales Con el reciente desarrollo de ligamiento enzimático y ligamiento químico nativo de fragmentos peptídicos, es posible preparar proteínas más grandes. Véase, p. ej., P. E. Dawson y S. B. H. Kent, Annu. Rev. Biochem, 69:923 (2000). El ligamiento peptídico químico y ligamiento químico nativo se describen en la patente estadounidense N.° 6.184.344, publicación de la patente estadounidense N.° 2004/0138412, publicación de la patente estadounidense N.° 2003/0208046, WO 02/098902 y WO 03/042235, que se incorporan al presente por referencia. Se ha utilizado un método biosintético general in vitro en el que un ARNt supresor químicamente acilado con el aminoácido no natural deseado se añade a un extracto in vitro que puede soportar la biosíntesis de proteínas, para incorporar en sitios específicos más de 100 aminoácidos no naturales en varias proteínas de prácticamente cualquier tamaño. Véase, p. ej., V. W. Cornish, D. Mendel y P. G. Schultz, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J, Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into

proteins, Science 244:182-188 (1989); y, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, J. Am. Chem. Soc. 111: 8013-8014 (1989). Se ha introducido una amplia serie de grupos funcionales en proteínas para estudios de estabilidad proteica, plegamiento proteico, mecanismo enzimático y transducción de señal.

Además de las referencias mencionadas en el presente, varios métodos de plegamiento de proteínas/purificación se conocen por los entendidos en la técnica, incluso, entre otros, los que se presentan en R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag y col. (1996) Protein Methods, 2ª edición Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Hams y Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd edition Springer Verlag, NY; Janson y Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, segunda edición Wiley-VCH, NY; y

Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ; y las referencias citadas allí.

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

En general, es ocasionalmente deseable desnaturalizar y reducir polipéptidos expresados y después provocar que los polipéptidos se vuelvan a plegar en la conformación preferida. Por ejemplo, puede se añadir guanidina, urea, DTT, DTE o una chaperonina a un producto de traducción de interés. Los métodos para reducir, desnaturalizar y re-naturalizar

proteínas son conocidos por los entendidos en la técnica (véase, las referencias anteriores, y Debinski, y col. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; y Buchner, y col., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski, y col., por ejemplo, describen la desnaturalización y reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. Las proteínas pueden volver a plegarse en un tampón redox que contiene, incluso, entre otros, glutatión oxidado y L-arginina. Los reactivos de replegamiento se pueden hacer fluir o mover de otro modo hasta entrar en contacto con el o los polipéptidos u otro producto de expresión o viceversa.

En el caso de producción procariota de polipéptido de relaxina, el polipéptido de relaxina producido de este modo se puede plegar erróneamente y por lo tanto tiene actividad biológica reducida o carece de ella. La bioactividad de la proteína se puede restaurar mediante “replegamiento”. En general, el polipéptido de relaxina plegado erróneamente se vuelve a plegar solubilizando (cuando el polipéptido de relaxina también es insoluble), desplegando y reduciendo la cadena de polipéptidos utilizando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (p. ej., urea o guanidina) y un agente reductor que pueden reducir enlaces disulfuro (p. ej. ditiotreitol, DTT o 2-mercaptoetanol, 2-ME). A una concentración moderada de caótropo, después se le añade un

agente oxidante (p. ej., oxígeno, cistina o cistamina), que permite la reformación de enlaces disulfuro. El polipéptido de relaxina se puede replegar utilizando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en las patentes estadounidense N.° 4.511.502, 4.511.503 y 4.512.922, que se incorporan al presente por referencia. El polipéptido de relaxina también se puede coplegar con otras proteínas para formar heterodímeros o heteromultímeros.

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

Después de la purificación, la relaxina se puede intercambiar en diferentes tampones o concentrar por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluso, entre otros, diafiltración y diálisis. La relaxina que se proporciona como una proteína purificada sencilla se puede someter a agregación y precipitación.

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

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

Métodos de purificación generales. Se pueden realizar cualquiera de varias etapas de aislamiento en el lisado celular, extracto, medio de cultivo, cuerpos de inclusión, espacio periplásmico de las células huésped, citoplasma de las células huésped u otro material, que comprende polipéptido de relaxina o en cualquiera de las mezclas de polipéptidos de relaxina resultantes de cualquier etapa de aislamiento incluso, entre otros, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel,

cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"), HPLC de fase inversa ("RP-HPLC"), adsorción de lecho expandido o cualquier combinación o repetición de las mismas y en cualquier orden adecuado.

Los equipos y otros materiales necesarios utilizados en la realización de las técnicas descritas en el presente están disponibles en el mercado. Bombas, colectores de fracciones, monitores, grabadoras y sistemas completos están disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA), BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) y Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway NJ). Materiales cromatográficos incluso, entre otros, materiales de matriz de intercambio, medios y tampones también están disponibles por dichas compañías.

Un equilibrio y otras etapas en los procedimientos de cromatografía en columna descritos en el presente, por ejemplo lavado y elución, se pueden lograr más rápidamente utilizando equipos especializados, por ejemplo una bomba. Las bombas disponibles en el mercado incluyen, entre otros, Bomba P-50 HILOAD®, Bomba Peristáltica P-1, Bomba P-901 y Bomba P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Ejemplos de colectores de fracciones incluyen colector de fracciones RediFrac, colector de fracciones FRAC-100 y FRAC-200 y colector de fracciones SUPERFRAC® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). También están disponibles a nivel comercial mezcladores para formar gradientes de

concentración lineales y de pH. Los mezcladores disponibles en el mercado incluyen mezclador de Gradiente GM-1 y mezcladores En-Línea (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

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

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

cuatro a veinticuatro horas. La mezcla de polipéptido de relaxina reducida y desnaturalizada después se puede aislar o purificar adicionalmente.

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

Cromatografía de intercambio iónico. En una realización y como una etapa adicional opcional, se puede realizar cromatografía de intercambio iónico en la primera mezcla de polipéptido de relaxina. Véase generalmente ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Las columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado incluyen columnas HITRAP®, HIPREP®, y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tales columnas utilizan intercambiadores aniónicos fuertes, por ejemplo Q SEPHAROSE® de flujo rápido, Q SEPHAROSE® de alto rendimiento y Q SEPHAROSE® XL;

intercambiadores catiónicos fuertes, por ejemplo SP SEPHAROSE® de alto rendimiento, SP SEPHAROSE® de flujo rápido y SP SEPHAROSE® XL; intercambiadores aniónicos débiles, por ejemplo DEAE SEPHAROSE® de flujo rápido; e intercambiadores catiónicos débiles, por ejemplo CM SEPHAROSE® de flujo rápido (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) Se puede realizar cromatografía en columna de intercambio aniónico o catiónico en el polipéptido de relaxina en cualquier etapa del proceso de purificación para aislar el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado. La etapa de cromatografía de intercambio catiónico se puede realizar utilizando cualquier matriz de intercambio catiónico adecuada. Las matrices de intercambio catiónico útiles incluyen, entre otros, materiales de matriz de intercambio catiónico fibrosas, porosas, no porosas, microgranulares, en perlas o reticuladas. Dichos materiales de matriz de intercambio catiónico incluyen, entre otros, celulosa, agarosa, dextrano, poliacrilato, polivinilo, poliestireno, sílice, poliéter o compuestos de cualquiera de los anteriores.

La matriz de intercambio catiónico puede ser cualquier intercambiador catiónico adecuado, incluso intercambiadores catiónicos fuertes y débiles. Los intercambiadores catiónicos fuertes pueden permanecer ionizados durante un amplio intervalo de pH y, por lo tanto, pueden ser capaces de unirse a relaxina durante un intervalo de pH amplio. Los

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

Antes de cargar la relaxina, la matriz de intercambio catiónico se puede equilibrar, por ejemplo, utilizando varios volúmenes de columna de un ácido débil diluido, p. ej., cuatro volúmenes de columna de 20 mM ácido acético, pH 3. Después del equilibrio, se puede añadir la relaxina y la columna se puede lavar de una a varias veces, antes de la elución de relaxina sustancialmente purificada, utilizando también una solución de ácido débil, por ejemplo una solución de ácido acético o ácido fosfórico débil. Por ejemplo, se pueden utilizar aproximadamente de 2 a 4 volúmenes de columna de 20 mM ácido acético, pH 3, para lavar la columna. También se pueden utilizar lavados adicionales, p. ej., utilizando 2-4 volúmenes de columna de 0,05 M acetato sódico, pH 5,5 o 0,05 M acetato sódico mezclado con 0,1 M cloruro sódico, pH 5,5. Alternativamente, utilizando métodos conocidos en la técnica, la matriz de intercambio catiónico se puede equilibrar utilizando varios volúmenes de columna de una base débil diluida.

Alternativamente, la relaxina sustancialmente purificada se puede eluir poniendo en contacto la matriz de intercambio catiónico con un tampón que tiene un pH o fuerza iónica suficientemente bajos para desplazar la relaxina de la matriz. El pH del tampón de elución puede variar de aproximadamente pH 2,5 a aproximadamente pH 6,0. Más específicamente, el pH del tampón de elución puede variar de

entre aproximadamente pH 2,5 y aproximadamente pH 5,5, entre aproximadamente pH 2,5 y aproximadamente pH 5,0. El tampón de elución puede tener un pH de aproximadamente 3,0. Además, la cantidad de tampón de elución puede variar ampliamente y generalmente estará en el intervalo de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 volúmenes de columna.

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

Cromatografía de fase inversa. Se puede realizar RP-HPLC para purificar proteínas siguiendo protocolos adecuados que se conocen por los entendidos en la técnica. Véase, p. ej., Pearson y col., ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982); Rivier y col., J. CHROM. (1983) 268:112-119; Kunitani y col., J. CHROM. (1986) 359:391-402. Se puede realizar RP-HPLC en el polipéptido de relaxina para aislar el polipéptido de relaxina sustancialmente purificado. A este respecto, se

pueden utilizar resinas derivatizadas con sílice con funcionalidades de alquilo con varias longitudes, incluso, entre otros, al menos aproximadamente C3, a al menos aproximadamente C30, al menos aproximadamente C3 a al menos aproximadamente C20 o al menos aproximadamente C3 a al menos aproximadamente C18. Alternativamente, se puede usar una resina polimérica. Por ejemplo, se puede utilizar resina TosoHaas Amberchrome CG1000sd, que es una resina de polímero de estireno. También se pueden utilizar resinas de polímeros o de ciano con diversas longitudes de cadena de alquilo. Además, la columna de RP-HPLC se puede lavar con un disolvente, por ejemplo etanol. La columna Source RP es otro ejemplo de una columna de RP-HPLC.

Se puede utilizar un tampón de elución adecuado que contenga un agente de emparejamiento de iones y un modificador orgánico, por ejemplo metanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo o etanol, para eluir el polipéptido de relaxina de la columna de RP-HPLC. Los agentes de emparejamiento de iones más comúnmente utilizados incluyen, entre otros, ácido acético, ácido fórmico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, ácido heptafluorobutírico, trietilamina, tetrametilamonio, tetrabutilamonio y acetato de trietilamonio. La elución se puede realizar utilizando uno o más gradientes o condiciones isocráticas, con condiciones de gradiente preferidas para

reducir el tiempo de separación y disminuir la anchura de los picos. Otro método implica el uso de dos gradientes con diferentes intervalos de concentración de disolvente. Ejemplos de tampones de elución adecuados para su uso en el presente pueden incluir, entre otros, soluciones de acetato de amonio y acetonitrilo.

Técnicas de purificación de cromatografía de interacción hidrófoba. Se puede realizar cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en el polipéptido de relaxina. Véase generalmente HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. N.° 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) que se incorpora al presente por referencia. Las matrices de HIC adecuadas pueden incluir, entre otras, matrices alquil o aril sustituidas, por ejemplo matrices butil, hexil, octil o fenil sustituidas, incluso matrices de agarosa, agarosa reticulada, sefarosa, celulosa, sílice, dextrano, poliestireno, poli(metacrilato) y resinas de modo mixto, incluso, entre otros, una resina de polietilenamina o una matriz de poli(metacrilato) butil o fenil sustituida. Las fuentes disponibles en el mercado para cromatografía en columna de interacción hidrófoba incluyen, entre otros, columnas HITRAP®, HIPREP® y HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)

En resumen, antes de la carga, la columna de HIC se puede equilibrar utilizando tampones convencionales conocidos

por los entendidos en la técnica, por ejemplo solución de ácido acético/cloruro sódico o HEPES que contiene sulfato de amonio. Se puede utilizar sulfato de amonio como el tampón para cargar la columna de HIC. Después de cargar el polipéptido de relaxina, después se puede lavar la columna utilizando tampones y condiciones convencionales para retirar los materiales no deseados pero conservando el polipéptido de relaxina en la columna de HIC. El polipéptido de relaxina se puede eluir con de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 volúmenes de columna de un tampón convencional, por ejemplo un tampón HEPES que contiene EDTA y concentración de sulfato de amonio más baja que el tampón de equilibrio o un tampón de ácido acético/cloruro sódico, entre otros. También se puede utilizar un gradiente salino lineal decreciente, por ejemplo, que utiliza un gradiente de fosfato potásico, para eluir las moléculas de relaxina. El eluyente después se puede concentrar, por ejemplo, mediante la filtración, por ejemplo diafiltración o ultrafiltración. Se puede utilizar diafiltración para retirar la sal utilizada para eluir el polipéptido de relaxina.

Otras técnicas de purificación. Se puede realizar otra etapa de aislamiento, utilizando, por ejemplo, filtración en gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (N.° de Cat. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), cromatografía de hidroxiapatita (las matrices adecuadas incluyen, entre

otros, HA-Ultrogel, alta resolución (Calbiochem), hidroxiapatita cerámica CHT (BioRad), hidroxiapatita Bio-Gel HTP (BioRad)), HPLC, adsorción de lecho expandido, ultrafiltración, diafiltración, liofilización y similares, en la primera mezcla de polipéptido de relaxina o cualquier mezcla posterior del mismo, para retirar cualquier exceso de sales y para reemplazar el tampón con un tampón adecuado para la siguiente etapa de aislamiento o incluso formulación del producto farmacológico final.

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

En realizaciones específicas de la presente invención, el rendimiento de la relaxina después de cada etapa de purificación puede ser de al menos aproximadamente el 30 %,

al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, al menos aproximadamente el 99,9 % o al menos aproximadamente el 99,99 % de la relaxina en el material de partida para cada etapa de purificación.

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

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

El material de DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en grupos de dietilaminoetilo (DEAE) que se unen mediante enlace covalente a la superficie de perlas de Sepharose. La unión del polipéptido de relaxina con los grupos DEAE se media mediante interacciones iónicas. El acetonitrilo y ácido trifluoroacético pasan a través de la columna sin retenerse. Después de que estas sustancias se hayan retirado por lavado, se retiran las impurezas traza lavando la columna con tampón de acetato a un pH bajo. Después la columna se lava con

tampón fosfato neutro y se eluye el polipéptido de relaxina con un tampón con fuerza iónica aumentada. La columna se empaqueta con DEAE Sepharose de flujo rápido. El volumen de columna se ajusta para asegurar una carga del polipéptido de relaxina en el intervalo de 3-10 mg de polipéptido de relaxina/ml de gel. La columna se lava con agua y tampón de equilibrio (fosfato sódico/potásico). Las fracciones agrupadas del eluato de HPLC se cargan y la columna se lava con tampón de equilibrio. Después la columna se lava con tampón de lavado (tampón de acetato sódico) seguido del lavado con tampón de equilibrio. Posteriormente, el polipéptido de relaxina se eluye de la columna con tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recoge en una fracción sencilla de acuerdo con el perfil de elución maestro. El eluato de la columna de DEAE Sepharose se ajusta a la conductividad especificada. La sustancia farmacológica resultante se esteriliza por filtración en frascos de Teflón y se almacena a -70 °C.

Los métodos adicionales que se pueden emplear incluyen, entre otros, etapas para retirar endotoxinas. Las endotoxinas son lipopoli-sacáridos (LPS) que se ubican en la membrana exterior de células huésped Gram negativas, por ejemplo, Escherichia coli. El entendido en la técnica conoce los métodos para reducir los niveles de endotoxinas que incluyen, entre otros, técnicas de purificación que utilizan soportes

de sílice, polvo de vidrio o hidroxiapatita, cromatografía de fase inversa, de afinidad, de exclusión por tamaño, de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, una combinación de estos procedimientos y similares. Se pueden necesitar modificaciones o métodos adicionales para retirar contaminantes, por ejemplo proteínas que migran conjuntamente del polipéptido de interés. Se conocen por el entendido en la técnica los métodos para medir los niveles de endotoxinas e incluyen, entre otros, ensayos de Lisado de Amebocito Limulus (LAL). El ensayo Endosafe™-PTS es un sistema colorimétrico, de tubo único que utiliza cartuchos precargados con reactivo LAL, sustrato cromogénico y endotoxina convencional de control junto con un espectrofotómetro portátil. Los métodos alternativos incluyen, entre otros, un método Kinetic LAL que es turbidimétrico y utiliza un formato de 96 pocillos.

Se pueden utilizar diversos métodos y procedimientos para evaluar el rendimiento y la pureza de una proteína de relaxina que comprende uno o más aminoácidos codificados no naturales, incluso, entre otros, el ensayo de Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE teñido con plata, SDS-PAGE teñido con coomassie, espectrometría de masas (incluso, entre otros, MALDI-TOF) y otros métodos para caracterizar proteínas conocidos por el entendido en la técnica.

Los métodos adicionales incluyen, entre otros: SDS-PAGE acoplado con métodos de tinción de proteínas, inmunotransferencia, desorción/ionización por láser asistido por matriz-espectrometría de masas (MALDI-MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas, centrado isoeléctrico, intercambio aniónico analítico, cromatocentrado y dicroísmo circular.

Se desarrolló un método in vivo, denominado incorporación por presión selectiva, para aprovechar la promiscuidad de sintetasas naturales. Véase, p. ej., N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder y R. Huber, FASEB J., 13:41 (1999). Una cepa auxotrófica, en la que la ruta metabólica relevante que provee a la célula un aminoácido natural particular se interrumpe, se cultiva en medio mínimo que contiene concentraciones limitadas del aminoácido natural, mientras que se reprime la transcripción del gen diana. Al comienzo de una fase de crecimiento estacionaria, se agota el aminoácido natural y se reemplaza con el análogo de aminoácido no natural. La inducción de expresión de la proteína recombinante da como resultado la acumulación de una proteína que contiene el análogo no natural. Por ejemplo, utilizando esta estrategia, se han incorporado o, m y p-fluorofenilalaninas en proteínas y muestran dos picos característicos en el espectro de UV que pueden identificarse

fácilmente, véase, p. ej., C. Minks, R. Huber, L. Moroder y N. Budisa, Anal. Biochem., 284:29 (2000); se ha utilizado trifluorometiona para reemplazar metionina en la lisozima del bacteriófago T4 para estudiar su interacción con ligandos quitooligosacáridos por RMN de ^{19}F, véase, p. ej., H. Duewel, E. Daub, V. Robinson y J. F. Honek, Biochemistry, 36:3404 (1997); y se ha incorporado trifluoroleucina en lugar de leucina, dando como resultado aumento de la estabilidad térmica y química de una proteína de cremallera de leucina Véase, p. ej., Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nalcajima, W. F. DeGrado y D. A. Tirrell, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 40:1494 (2001). Además, se incorporan selenometionina y telurometionina en diversas proteínas recombinantes para facilitar la solución de fases en cristalografía de rayos X. Véase, p. ej., W. A. Hendrickson, J. R. Horton y D. M. Lemaster, EMBO J., 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda y M. Hatada, Nat. Struct. Biol., 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann y R. Huber, Eur. J. Biochem., 230:788 (1995); y N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder y R. Huber, J. Mol. Biol., 270:616 (1997). También se han incorporado de forma eficaz análogos de metionina con funcionalidades de alqueno o alquino, posibilitando la modificación adicional de proteínas por medios químicos.

Véase, p. ej., J. C. van Hest y D. A. Tirrell, FEBS Lett., 428:68 (1998); J. C. van Hest, K, L. Kiick y D. A, Tirrell, J. Am. Chem. Soc., 122:1282 (2000); y, K. L. Kiick y D. A. Tirrell, Tetrahedron, 56:9487 (2000); patente estadounidense N.° 6.586.207; publicación de patente estadounidense 2002/0042097, que se incorpora en el presente por referencia. El éxito de este método depende del reconocimiento de los análogos de aminoácidos no naturales por aminoacil-ARNt sintetasas que, en general, requieren alta selectividad para asegurar la fidelidad de la traducción de proteínas. Un modo de expandir el alcance de este método es relajar la especificidad de sustrato de las aminoacil-ARNt sintetasas, que se ha conseguido en un número limitado de casos. Por ejemplo, el reemplazo de Ala^{294} por Gly en fenilalanil-ARNt sintetasa de Escherichia coli (PheRS) aumenta el tamaño del bolsillo de unión a sustrato y da como resultado la acilación de ARNtPhe por p-Cl-fenilalanina (p-Cl-Phe) Véase, M. Tbba, P. Kast y H. Hennecke, Biochemistry, 33:7107 (1994). Una cepa de Escherichia coli que alberga esta PheRS mutante permite la incorporación de p-Cl-fenilalanina o p-Br-fenilalanina en lugar de fenilalanina. Véase, p. ej., M, Ibba y H. Hennecke, FEBS Lett., 364:272 (1995); y N. Sharma, R. Furter, P. Kast y D. A. Tirrell, FEBS Lett., 467:37 (2000). De forma similar, se mostró que una mutación puntual Phe130Ser cerca del sitio de unión de aminoácidos de tirosil-ARNt sintetasa de

Escherichia coli permitía que se incorporara azatirosina de forma más eficaz que tirosina. Véase, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soil y S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000).

Otra estrategia para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas in vivo es modificar sintetasas que tienen mecanismos de corrección. Estas sintetasas no pueden diferenciar y por lo tanto activar aminoácidos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales afines. Este error se corrige en un sitio separado, que desacila el aminoácido cargado de forma incorrecta del ARNt para mantener la fidelidad de la traducción de la proteína. Si la actividad de corrección de la sintetasa se deshabilita, los análogos estructurales que están activados de forma errónea pueden escapar a la función de edición e incorporarse. Este enfoque se ha demostrado recientemente con la valil-ARNt sintetasa (ValRS). Véase, V. Doring, H. D. Mootz, L. A, Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel y P, Marliere, Science. 292:501 (2001). ValRS puede aminoacilar incorrectamente ARNtVal con Cys, Thr o aminobutirato (Abu); estos aminoácidos no afines se hidrolizan posteriormente por el dominio de edición. Después de mutagénesis aleatoria del cromosoma de Escherichia coli, se seleccionó una cepa mutante de Escherichia coli que tiene una mutación en el sitio de edición de ValRS. Esta ValRS

defectuosa para edición carga incorrectamente ARNtVal con Cys. Debido a que Abu se asemeja de forma estérica a Cys (el grupo –SH de Cys se reemplaza con –CH3 en Abu), la ValRS mutante también incorpora Abu en proteínas cuando esta cepa mutante de Escherichia coli se cultiva en presencia de Abu. El análisis espectrométrico de masas muestra que aproximadamente el 24 % de las valinas se reemplazan por Abu en cada posición de valina en la proteína nativa.

Los métodos de síntesis de fase sólida y semisintéticos también han posibilitado la síntesis de varias proteínas que contienen nuevos aminoácidos. Por ejemplo, véase las siguientes publicaciones y las referencias citadas en las mismas, que son de la siguiente manera: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. Nature. 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S- peptide fragment, J. Am Chem. 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enyzmes, Acc Chem Res. 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, J Am Chem Soc. 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides:

backbone- engineered HIV protease, Science. 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, CRC Crit Rev Biochem. 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? Protein Eng. 1(3): 151-157 (1987); y Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C. Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, Science. 266(5183):243(1994).

Se ha utilizado la modificación química para introducir una diversidad de cadenas laterales no naturales, incluso cofactores, marcadores de espín y oligonucléotidos en proteínas in vitro. Véase, p. ej., Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, Science. 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, Annu Rev Biochem. 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T,, Lawrence, D.S. Chemical mutation of enyzme active sites, Science. 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, J Biol. Chem. 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L, et M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. J. Am Chem Soc. 88:3153-3154 (1966); y Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic

probes into antibody combining sites, Science. 242(4881):1038-1040 (1988).

Alternativamente, se han usado métodos biosintéticos que emplean aminoacil-ARNt modificados químicamente para incorporar varias sondas biofísicas en proteínas sintetizadas in vitro. Véase las siguientes publicaciones y las referencias citadas en las mismas: Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, Annu. Rev Biochem, 62:483-514 (1993); y, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, Proc. Natl. Acad. Sci. 83(22):8604-8608 (1986).

Previamente, se ha demostrado que los aminoácidos no naturales se pueden incorporar en sitios específicos en proteínas in vitro mediante la adición de ARNt supresor aminoacilado químicamente para reacciones de síntesis proteica programadas con un gen que contiene una mutación sin sentido ámbar deseada. Utilizando estos enfoques, se pueden sustituir varios de los veinte aminoácidos comunes con homólogos estructurales cercanos, p. ej., fenilalanina con fluorofenilalanina, utilizando cepas auxotrópicas para un aminoácido particular. Véase, p. ej., Noren, C.J,, Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into

proteins, Science, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, y col., Science 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, J. Am Chem Soc, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa y col., FASEB J. 13:41-51(1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. Methods in Enz., vol. 202, 301-336 (1992); y, Mendel, D., Comish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24, 435-62 (1995).

Por ejemplo, se preparó un ARNt supresor que reconocía el codón de parada UAG y se aminoaciló químicamente con un aminoácido no natural. Se utilizó mutagénesis dirigida convencional para introducir el codón de parada TAG, en el sitio de interés, en el gen de la proteína. Véase, p. ej., Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5’-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802 (1988). Cuando el ARNt supresor acilado y el gen mutante se combinaron en un sistema de transcripción/traducción in vitro, el aminoácido no natural se incorporó en respuesta al codón UAG que proporcionó una proteína que contenía ese aminoácido en la posición especificada. Los experimentos que utilizaron [^{3}H]-

Phe y los experimentos con ahidroxi ácidos demostraron que solamente los aminoácidos deseados se incorporan en la posición especificada por el codón UAG y que este aminoácido no se incorpora en ningún otro sitio en la proteína. Véase, p. ej., Noren, y col., mencionado anteriormente, Kobayashi y col., (2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432; y, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, Science. 255(5041): 197-200 (1992).

Un ARNt se puede aminoacilar con un aminoácido deseado a través de cualquier método o técnica, incluso, entre otros, aminoacilación química o enzimática.

La aminoacilación se puede lograr mediante aminoacil ARNt sintetasas o mediante otras moléculas enzimáticas, incluso, entre otros, ribozimas. El término "ribozima" es intercambiable con "ARN catalítico". Cech y colaboradores (Cech, 1987, Science, 236:1532-1539; McCorkle y col., 1987, Concepts Biochem. 64:221-226) demostraron la presencia de ARN natural que pueden actuar como catalizadores (ribozimas). Sin embargo, aunque sólo se ha mostrado que estos catalizadores de ARN naturales actúan en sustratos de ácido ribonucleico para escisión y corte y empalme, el reciente desarrollo de evolución artificial de ribozimas ha expandido el repertorio de catálisis a diversas reacciones químicas. Los estudios han identificado moléculas de ARN que pueden catalizar enlaces de

aminoacil-ARN en sus propios extremos(2')3' (Illangakekare y col., 1995 Science 267:643-647) y una molécula de ARN que puede transferir un aminoácido de una molécula de ARN a otra (Lohse y col., 1996, Nature 381:442-444).

La Publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0228593, que se incorpora el presente por referencia, describe métodos para construir ribozimas y su uso en aminoacilación de ARNt con aminoácidos codificados naturales y no naturales. Las formas inmovilizadas de sustrato de moléculas enzimáticas que pueden aminoacilar ARNt, incluso, entre otros, ribozimas, pueden permitir la purificación de afinidad eficaz de los productos aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen agarosa, sepharosa y perlas magnéticas. La producción y uso de una forma inmovilizada de sustrato de ribozima para aminoacilación se describe en Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 y publicación de solicitud de patente estadounidense 2003/0228593, que se incorporan al presente por referencia.

Los métodos de aminoacilación química incluyen, entre otros, los introducidos por Hecht y col. (Hecht, S. M, Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517) y por Schultz, Chamberlin, Dougherty y otros (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew.

Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J, A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S, J.; Griffith, M. C.; Schultz, P.G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. y col., Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D, A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, y col. J. Biol, Chem, 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. y col. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. y col. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. y col. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34), que se incorporan en el presente por referencia, para evitar el uso de sintetasas en la aminoacilación. Dichos métodos u otros métodos de aminoacilación química se pueden utilizar para aminoacilar moléculas de ARNt.

Los métodos para generar ARN catalítico pueden implicar generar grupos separados de secuencias de ribozimas aleatorias, realizar evolución dirigida en los grupos, explorar los grupos con respecto a actividad de aminoacilación deseable y seleccionar secuencias de las ribozimas que muestran actividad de aminoacilación deseada.

Los ribozimas pueden comprender motivos o regiones que facilitan la actividad de acilación, por ejemplo un motivo de GGU y una región con alto contenido en U. Por ejemplo, se ha indicado que las regiones con alto contenido en U pueden

facilitar el reconocimiento de un sustrato de aminoácidos y un motivo GGU puede formar pares de bases con los extremos 3' de un ARNt. En combinación, el GGU y motivo y región con alto contenido en U facilitan el reconocimiento simultáneo tanto del aminoácido como del ARNt simultáneamente y de este modo facilitan la aminoacilación del extremo 3' del ARNt.

Se pueden generar ribozimas por selección in vitro utilizando un r24mini parcialmente aleatorizado conjugado con $tRNA^{Asn}_{CCCG}$, seguido de la obtención por ingeniería genética sistemática de una secuencia consenso hallada en los clones activos. Un ribozima ejemplar obtenido a través de este método se denomina "ribozima Fx3" y se describe en la solicitud de publicación estadounidense N.° 2003/0228593, actúa como un catalizador versátil para la síntesis de diversos aminoacil-ARNt cargados con aminoácidos no naturales afines.

Se puede utilizar inmovilización en un sustrato para permitir la purificación de afinidad eficaz de los ARNt aminoacilados. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen, entro otros, agarosa, sepharose y perlas magnéticas. Los ribozimas se pueden inmovilizar en resinas aprovechando la estructura química del ARN, tal como el 3'-cis-diol en el ribosa de ARN que se puede oxidar con periodato para producir el dialdehído correspondiente para facilitar la inmovilización del ARN en la resina. Se pueden utilizar

diversos tipos de resinas incluso resinas de hidrazida económicas en las que la aminación reductiva hace de la interacción entre la resina y la ribozima un enlace irreversible. Se puede facilitar significativamente la síntesis de aminoacil-ARNt mediante esta técnica de aminoacilación en columna. Kourouklis y col. Methods 2005; 36:239-4 describen un sistema de aminoacilación basado en columna.

El aislamiento de los ARNt aminoacilados se puede lograr de diversas maneras. Un método adecuado es eluir los ARNt aminoacilados de una columna con un tampón, por ejemplo una solución de acetato sódico con 10 mM EDTA, un tampón que contiene 50 mM N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(3-ácido propanosulfónico), 12,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM EDTA o simplemente agua tamponada con EDTA (pH 7,0).

Los ARNt aminoacilados se pueden añadir a reacciones de traducción para incorporar el aminoácido con el que el ARNt se aminoaciló en una posición seleccionada en un polipéptido compuesto a través de la reacción de traducción. Ejemplos de sistemas de traducción en los que los ARNt aminoacilados de la presente invención se pueden utilizar, incluyen, entre otros, lisados celulares. Los lisados celulares proporcionan componentes de reacción necesarios para traducción in vitro de un polipéptido a partir de un ARNm de entrada. Ejemplos de tales componentes de reacción incluyen, entre otros,

proteínas ribosomales, ARNr, aminoácidos, ARNt, GTP, ATP, factores de inicio de la traducción y elongación y factores adicionales asociados con la traducción. Adicionalmente, los sistemas de traducción pueden ser traducciones discontinuas o traducción compartimentalizada. Los sistemas de traducción discontinuos combinan componentes de reacción en un compartimento sencillo mientras que los sistemas de traducción compartimentalizados separan los componentes de reacción de traducción de los productos de reacción que pueden inhibir la eficacia de la traducción Dichos sistemas de traducción están disponibles en el mercado.

Además, se puede utilizar un sistema de transcripción/traducción acoplado. Los sistemas de transcripción/traducción acoplados posibilitan la transcripción de un ADN de entrada a un ARNm correspondiente, que a su vez se traduce por los componentes de reacción. Un ejemplo de una transcripción/traducción acoplado disponible en el mercado es el Sistema de Traducción Rápida (RTS, Roche Inc.) El sistema incluye una mezcla que contiene lisado de E. coli para proporcionar componentes traduccionales, por ejemplo ribosomas y factores de traducción. Adicionalmente, se incluye una ARN polimerasa para la transcripción del ADN de entrada en un molde de ARNm para su uso en la traducción. RTS puede utilizar compartimentalización de los componentes de reacción por medio de una membrana interpuesta entre los

compartimentos de reacción, incluso un compartimento de suministro/residuos y un compartimiento de transcripción/traducción.

La aminoacilación de ARNt se puede realizar mediante otros agentes, incluso, entre otros, transferasas, polimerasas, anticuerpos catalíticos, proteínas multifuncionales y similares.

Stephan en Scientist 10 de octubre de 2005; páginas 30-33 describe métodos adicionales para incorporar aminoácidos codificados no naturales en proteínas. Lu y col. en Mol Cell. 2001 Oct; 8(4):759-69 describen un método en el que una proteína se liga químicamente a un péptido sintético que contiene aminoácidos no naturales (ligamiento de proteína expresada).

También se han utilizado técnicas de microinyección para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas. Véase, p. ej., M, W. Nowak, P. C, Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G, Schultz, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Science, 268:439 (1995); y, D. A. Dougherty, Curr. Onin. Chem. Biol., 4:645 (2000). Se coinyectaron en un oocito de Xenopus dos especies de ARN preparadas in vitro: un ARNm que codificaba la proteína diana con un codón de parada UAG en la posición del aminoácido de interés y un ARN supresor ámbar aminoacilado con el

aminoácido no natural deseado. La maquinaria de traducción del oocito después inserta el aminoácido no natural en la posición especificada por UAG. Este método ha permitido estudios de función estructural in vivo de proteínas de membrana integrales, que generalmente no son aptos para sistemas de expresión in vitro. Los ejemplos incluyen la incorporación de un aminoácido fluorescente en el receptor de taquikinina neurokinina-2 para medir distancias mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, véase, por ejemplo, G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel y A. Chollet, L Biol. Chem., 271:19991 (1996) ; la incorporación de aminoácidos biotinilados para identificar restos expuestos en superficie en canales iónicos, véase, por ejemplo, J. P. Gallivan, H. A. Lester y D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997) ; el uso de análogos de tirosina enjaulados para controlar cambios conformacionales en un canal de iones en tiempo real, véase, por ejemplo, J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998) ; y el uso de alfa hidroxi aminoácidos para cambiar las estructuras de un canal iónico para explorar sus mecanismos de apertura. Véase, p. ej., P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty y H. A. Lester, Cell, 96:89 (1999) ; y, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz y J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001).

La capacidad de incorporar aminoácidos no naturales directamente en proteínas in vivo ofrece diversas ventajas, incluso, entre otros, altos rendimientos de proteínas mutantes, facilidad técnica, el potencial para estudiar las proteínas mutantes en células o posiblemente en organismos vivos y el uso de estas proteínas mutantes en tratamientos terapéuticos y usos de diagnóstico. La capacidad de incluir aminoácidos no naturales con distintos tamaños, acideces, nucleofilias, hidrofobicidades y otras propiedades en proteínas puede expandir en gran medida la capacidad de manipular racional y sistemáticamente las estructuras de proteínas, tanto para explorar la función proteica como para crear nuevas proteínas u organismos con nuevas propiedades.

En un intento de incorporar en sitios específicos para-F-Phe, se utilizó un par ARNtPheCUA supresor ámbar de levadura/fenialanil-ARNt sintetasa en una cepa de Escherichia coli auxotrófica de Phe resistente a p-F-Phe. Véase, p. ej., R. Furter, Protein Sci., 7:419(1998).

También es posible obtener expresión de un polinucleótido de relaxina de la presente invención utilizando un sistema de traducción sin células (in vitro). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o sin células y pueden ser procariotas o eucariotas. Los sistemas de traducción celulares incluyen, entre otros, preparaciones celulares completas, por ejemplo células permeabilizadas o

cultivos celulares en los que una secuencia de ácido nucleico deseada se puede transferir a ARN y el ARNm se puede traducir. Están disponibles en el mercado sistemas de traducción sin células y se conocen bien muchos tipos de sistemas diferentes. Ejemplos de sistemas sin células incluyen, entre otros, lisados procariotas, por ejemplo lisados de Escherichia coli, y lisados eucariotas, por ejemplo extractos de germen de trigo, lisados de células de insecto, lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo y lisados de células humanas. Se pueden preferir extractos o lisados eucariotas cuando la proteína resultante está glucosilada, fosforilada o modificada de otro modo debido a que muchas de dichas modificaciones solamente son posibles en sistemas eucariotas. Algunos de estos extractos y lisados están disponibles en el mercado (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y). También están disponibles extractos membranosos, por ejemplo los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsomales, que son útiles para traducir proteínas secretoras. En estos sistemas, que pueden incluir ARNm como un molde (traducción in vitro) o ADN como un molde (transcripción y traducción in vitro combinadas), la síntesis in vitro se dirige por los ribosomas. Se ha aplicado un considerable esfuerzo al desarrollo de sistemas de expresión

de proteínas sin células. Véase, p. ej., Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. y J.R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, Biotechnology Progress, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., y J.R. Swartz, Biotechnology and Bioengineering, 66, 180-188, (1999); y Patnaik, R. y J,R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); patente estadounidense N.° 6.337.191; publicación de patente estadounidense N.° 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785, que se incorporan al presente por referencia. Otro enfoque que se puede aplicar a la expresión de polipéptidos de relaxina que comprenden un aminoácido codificado no natural incluye la técnica de fusión de péptido-ARNm. Véase, p. ej., R. Roberts y J.Szostak, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, y col., Chemistry & Biology 10:1043-1050 (2003). En este enfoque, un molde de ARNm unido a una puromicina se traduce a péptido en el ribosoma. Si se ha modificado una o más moléculas de ARNt, también se pueden incorporar aminoácidos no naturales en el péptido. Después de que se ha leído el último codón de ARNm, la puromicina captura el extremo carboxilo terminal del péptido. Si se descubre que el conjugado de ARNm-péptido resultante tiene propiedades interesantes en un ensayo in vitro, su identidad se puede revelar fácilmente a partir de la secuencia de ARNm. De esta manera, se pueden explorar genotecas de polipéptidos

de relaxina que comprenden uno o más aminoácidos codificados no naturales para identificar polipéptidos que tengan propiedades deseadas. Más recientemente, se han presentado traducciones de ribosomas in vitro con componentes purificados que permiten la síntesis de péptidos sustituidos con aminoácidos codificados no naturales. Véase, p. ej., A. Forster y col., Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

También se pueden utilizar sistemas de traducción reconstituidos. También se han utilizado mezclas de factores de traducción purificados de forma exitosa para traducir ARNm a proteína así como combinaciones de lisados o lisados complementados con factores de traducción purificados, por ejemplo factor de inicio-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α o β), factor de elongación T (EF-Tu) o factores de terminación. Los sistemas sin células también pueden ser sistemas de transcripción/traducción acoplados en los que se introduce ADN al sistema, se transcribe ARNm y el ARNm se traduce como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col. editores, Wiley Interscience, 1993), que se incorpora en el presente por referencia. El ARN transcrito en sistema de transcripción eucariota puede estar en forma de ARN heteronuclear (ARNhn) o ARN maduro con extremos 5′ terminales (7-metil guanosina) y cola de poli A en el extremo 3′, que pueden ser una ventaja en determinados sistemas de

traducción. Por ejemplo, los ARNm protegidos se traducen con alta eficacia en el sistema de lisado de reticulocitos.

Polímeros macromoleculares acoplados a polipéptidos de relaxina

Se pueden efectuar diversas modificaciones a los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente utilizando las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritas aquí. Estas modificaciones incluyen la incorporación de funcionalidad adicional en el componente de aminoácido no natural del polipéptido, incluso, entre otros, un marcador, un tinte, un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado de polietilenglicol, un fotoentrecruzador, un radionucleido, un compuesto citotóxico, un fármaco, un marcador de afinidad, un marcador de fotoafinidad, un compuesto reactivo, una resina, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un quelante de metal, un cofactor, un ácido graso, un carbohidrato, un polinucleótido, un ADN, un ARN, un polinucleótido antisentido, un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, ácido ribonucleico inhibidor, un biomaterial, una nanopartícula, un marcador de espín, un fluoróforo, una fracción que contiene metal, una fracción radioactiva, un nuevo grupo funcional, un grupo que interactúa por enlace covalente o no covalente con otras moléculas, una fracción fotoliberadora, una fracción

excitable por radiación actínica, una fracción fotoisomerizable, biotina, un derivado de biotina, un análogo de biotina, una fracción que incorpora un átomo pesado, un grupo químicamente escindible, un grupo fotoescindible, una cadena lateral alargada, un azúcar unido a carbono, un agente de reducción activo, un aminotioácido, una fracción tóxica, un grupo etiquetado isotópicamente, una sonda biofísica, un grupo fosforescente, un grupo quimioluminiscente, un grupo electrodenso, un grupo magnético, un grupo intercalante, un cromóforo, un agente de transferencia de energía, un agente activo desde el punto de vista biológico, un marcador detectable, una molécula pequeña, un punto cuántico, un nanotransmisor, un radionucleótido, un radiotransmisor, un agente de captura de neutrones, o cualquier combinación de los anteriores o cualquier otro compuesto o sustancia deseable. Como ejemplo no limitante ilustrativo de las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritos en el presente, la siguiente descripción se centrará en la adición de polímeros macromoleculares al polipéptido de aminoácidos no naturales con el entendimiento de que las composiciones, métodos, técnicas y estrategias descritos para ello también son aplicables (con modificaciones apropiadas, si fuera necesario y para las que un experto en la materia podría hacer con las divulgaciones del presente documento)

para añadir otras funcionalidades, incluso, entre otros, las enumeradas anteriormente.

Una amplia variedad de polímeros macromoleculares y otras moléculas se pueden unir a los polipéptidos de relaxina de la presente invención para modular las propiedades biológicas del polipéptidos de relaxina o proporcionar nuevas propiedades biológicas a la molécula de relaxina. Estos polímeros macromoleculares pueden unirse al polipéptido de Relaxina mediante un aminoácido codificado natural, mediante un aminoácido codificado no natural, cualquier sustituyente funcional de un aminoácido natural o no natural o cualquier sustituyente o grupo funcional añadido a un aminoácido natural o no natural. El peso molecular del polímero puede ser de un amplio intervalo, incluso, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluso, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre

aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50,000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

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

También se puede elegir preparar una mezcla de moléculas de conjugado polímero:proteína y la ventaja proporcionada en el presente es que se puede seleccionar la

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

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

Ejemplos de polímeros incluyen, entre otros, polialquil éteres y análogos con extremos protegidos por alcoxi de los mismos (p. ej., polioxietilenglicol, polioxietilen/propilenglicol y análogos con extremos protegidos por metoxi o epoxi de los mismos, especialmente polioxietilenglicol, conociéndose este último también como polietilenglicol o PEG) ; polivinilpirrolidonas; polivinilalquil éteres; polioxazolinas, polialquil oxazolinas y polihidroxialquil oxazolinas; poliacrilamidas, polialquil acrilamidas y polihidroxialquil acrilamidas (p. ej., polihidroxipropilmetacrilamida y derivados de la misma) ;

polihidroxialquil acrilatos; ácidos polisiálicos y análogos de los mismos; secuencias de péptidos hidrófilos; polisacáridos y sus derivados, incluyendo dextrano y derivados de dextrano, p. ej., carboximetildextrano, dextrano sulfatos, aminodextrano; celulosa y sus derivados, p. ej., carboximetil celulosa, hidroxialquil celulosas; quitina y sus derivados, p. ej., quitosán, succinil quitosán, carboxiraetilquitina, carboximetilquitosán; ácido hialurónico y sus derivados; almidones; alginatos; condroitín sulfato; albúmina; pululano y carboximetil pululano; poliaminoácidos y derivados de los mismos, p. ej., ácidos poliglutámicos, polilisinas, ácidos poliaspárticos, poliaspartamidas; copolímeros de anhídrido maleico tales como: copolímero de anhídrido maleico de estireno, copolímero de diviniletil éter y anhídrido maleico; alcoholes polivinílicos; copolímeros de los mismos; terpolímeros de los mismos; mezclas de los mismos; y derivados de los anteriores.

La proporción de moléculas de polietilenglicol para moléculas de proteína variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, se puede determinar la relación óptima (con respecto a eficacia de reacción debido a que hay un exceso mínimo de proteína o polímero que no ha reaccionado) por el peso molecular del polietilenglicol seleccionado y por el número de grupos reactivos disponibles. En relación con el peso molecular, típicamente cuanto mayor

sea el peso molecular del polímero, menor será el número de moléculas de polímero que se pueden unir a la proteína. De forma similar, la ramificación del polímero debería tenerse en cuenta cuando se optimizan estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o haya más ramas) mayor será la relación de polímero:proteína.

Según se utiliza aquí, y cuando se contemplan conjugados de PEG:polipéptido de relaxina, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona el beneficio deseado a un paciente. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de varios factores, incluso la condición física global del paciente y la causa subyacente de la afección que se tiene que tratar. La cantidad de polipéptido de relaxina utilizada para terapia proporciona una tasa aceptable de cambio y mantiene la respuesta deseada a un nivel beneficioso. Un entendido en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad terapéuticamente eficaz de las presentes composiciones usando materiales y procedimientos públicamente disponibles.

El polímero soluble en agua puede ser cualquier forma estructural incluso, entre otros, lineal, bifurcado o ramificado. Típicamente, el polímero soluble en agua es un poli (alquilenglicol), por ejemplo poli(etilenglicol)(PEG), pero también pueden emplearse otros polímeros solubles en

agua. A modo de ejemplo, se utiliza PEG para describir determinadas realizaciones de la presente invención.

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

$$XO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}Y$$

en donde n es de 2 a 10.000 y X es H o una modificación terminal, incluso, entre otros, un alquilo $C_{1\text{-}4}$, un grupo protector o un grupo funcional terminal.

En algunos casos, un PEG utilizado en la invención termina en un extremo con hidroxi o metoxi, es decir, X es H o CH_3 ("metoxi PEG"). Alternativamente, el PEG puede terminar con un grupo reactivo, formando así un polímero bifuncional. Los grupos reactivos típicos pueden incluir los grupos reactivos que se utilizan habitualmente para reaccionar con los grupos funcionales hallados en los 20 aminoácidos comunes (incluso, entre otros, grupos maleimido, carbonatos activados (incluso, entre otros, p-nitrofenil éster), ésteres activados

(incluso, entre otros, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenil éster) y alehídos) así como grupos funcionales que son inertes para los 20 aminoácidos comunes pero que reaccionan específicamente con grupos funcionales complementarios presentes en aminoácidos codificados no naturales (incluso, entre otros, grupos azida, grupos alquino). Se observa que el otro extremo del PEG, que se muestra en la fórmula anterior mediante Y, se unirá directa o indirectamente a un polipéptido de relaxina mediante aminoácido no natural o codificado no natural. Por ejemplo, Y puede ser un enlace de urea, amida o carbamato con un grupo amina (incluso, entre otros, la amina epsilon de lisina o el extremo amino terminal) del polipéptido. Alternativamente, Y puede ser un enlace de maleimida con un grupo tiol (incluso, entre otros, el grupo tiol de cisteína). Alternativamente, Y puede ser un enlace con un resto no accesible habitualmente mediante los 20 aminoácidos comunes. Por ejemplo, Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un grupo azida en el PEG con un grupo alquino en el polipéptido de relaxina para formar un producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Alternativamente, se puede hacer reaccionar un grupo alquino en el PEG con un grupo azida presente en un aminoácido codificado no natural para formar un producto similar. En algunas realizaciones, se puede hacer reaccionar un nucleófilo fuerte (incluso, entre otros, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, semicarbazida)

con un grupo aldehído o cetona presente en un aminoácido codificado no natural para formar una hidrazona, oxima o semicarbazona, según sea aplicable, que en algunos casos se puede reducir adicionalmente por tratamiento con un agente reductor apropiado. Alternativamente, el nucleófilo fuerte se puede incorporar en el polipéptido de relaxina mediante un aminoácido codificado no natural y se puede utilizar para reaccionar preferentemente con un grupo cetona o aldehído presente en el polímero soluble en agua.

Se puede utilizar cualquier masa molecular para un PEG según se desee de forma práctica, incluso, entre otros, de aproximadamente 100 Daltones (Da) a 100.000 Da o más según se desee (incluso, entre otros, en ocasiones 0,1-50 kDa o 10-40 kDa). El peso molecular del PEG puede ser de un amplio intervalo, incluso, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluso, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y

aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, PEG puede estar entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. También se puede utilizar PEG de cadena ramificada, incluso, entre otros, moléculas de PEG en las que cada cadena tiene un MW que varía de 1 a 100 kDa (incluso, entre otros, 1-50 kDa o 5-20 kDa). El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser, incluso, entre otros, entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada puede ser de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluso, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da y 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso

molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena del PEG de cadena ramificada es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. Se describe una amplia serie de moléculas de PEG, incluso, entre otros, en el catálogo de Shearwater Polymers, Inc., catálogo de Nektar Therapeutics, que se incorporan al presente por referencia.

Generalmente, al menos un extremo terminal de la molécula de PEG está disponible para la reacción con el aminoácido codificado no natural. Por ejemplo, se pueden utilizar derivados de PEG que portan fracciones alquino y azida para reacción con cadenas laterales de aminoácidos para unir PEG a aminoácidos codificados no naturales como describe aquí. Si el aminoácido codificado no natural comprende una azida entonces el PEG típicamente, tendrá una fracción alquino para efectuar formación del producto de cicloadición [3+2] o una especie de PEG activada (es decir, éster, carbonato), que contiene un grupo fosfino para efectuar la formación del enlace de amida. Alternativamente, si el aminoácido codificado no natural comprende un alquino, entonces el PEG típicamente contendrá una fracción azida para

efectuar la formación del producto de cicloadición de Huisgen [3+2]. Si el aminoácido codificado no natural comprende un grupo carbonilo, el PEG típicamente comprenderá un nucleófilo potente (incluso, entre otros, una funcionalidad de hidrazida, hidrazina, hidroxilamina o semicarbazida) para efectuar la formación de enlaces de hidrazona, oxima y semicarbazona correspondientes, respectivamente. En otras alternativas, se puede utilizar una orientación inversa de los grupos reactivos descritos anteriormente, es decir, una fracción azida en el aminoácido codificado no natural se puede hacer reaccionar con un derivado de PEG que contiene un alquino.

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

La invención proporciona en algunas realizaciones derivados de polímero que contienen azida y acetileno que comprenden una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da a aproximadamente 100.000 Da. La estructura polimérica del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol). Sin embargo, se entenderá que una amplia diversidad de polímeros solubles en agua, incluso, entre otros, poli(etilen)glicol y

otros polímeros relacionados, incluyendo poli(dextrano) y poli(propilenglicol), también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli (etilenglicol) pretende abarcar e incluir todas de tales moléculas. El término PEG incluye, entre otros, poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo PEG bifuncional, PEG con múltiples ramas, PEG derivatizado, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes de la estructura polimérica) o PEG con enlaces degradables en el mismo.

PEG es típicamente transparente, incoloro, inodoro, soluble en agua, estable frente al calor, inerte para muchos agentes químicos, no hidroliza ni se deteriora y generalmente no es tóxico. Se considera que el poli(etilenglicol) es biocompatible, lo que significa que PEG puede coexistir con tejidos u organismos vivos sin causarles daño. Más específicamente, PEG es sustancialmente no inmunogénico, lo que significa que PEG no tiende a producir una respuesta inmune en el cuerpo. Cuando se une a una molécula que tiene alguna función deseable en el cuerpo, por ejemplo un agente biológicamente activo, el PEG tiende a enmascarar el agente y puede reducir o eliminar cualquier respuesta inmune de modo que un organismo puede tolerar la presencia del agente. Los conjugados de PEG no tienden a producir una respuesta inmune

considerable o provocar coagulación u otros efectos no deseables. El PEG que tienen la fórmula --CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$--CH_2CH_2--, en donde n es de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4000, típicamente de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 2000, es adecuado para uso en la presente invención. PEG que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, en algunas realizaciones de la presente invención, es particularmente útil como la estructura polimérica. El peso molecular del PEG puede ser de un amplio intervalo, incluso, entre otros, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular de PEG puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluso, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de PEG es de entre

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

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

una de las cuales se incorpora por referencia a la presente en su totalidad, como la estructura polimérica.

El PEG ramificado también puede estar en forma de un PEG bifurcado representado por $PEG(--YCHZ_2)_n$, en donde Y es un grupo de enlace y Z es un grupo terminal activado unido a CH por una cadena de átomos de longitud definida.

Otra forma ramificada más, el PEG colgante, tiene grupos reactivos, por ejemplo carboxilo, a lo largo de la estructura de PEG en lugar del extremo de las cadenas de PEG.

Además de estas formas de PEG, el polímero también se puede preparar con enlaces débiles o degradables en la estructura. Por ejemplo, PEG se puede preparar con enlaces de éster en la estructura polimérica que se someten a hidrólisis. Como se muestra a continuación, esta hidrólisis provoca la escisión del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo:

$$\text{-PEG-CO}_2\text{-PEG-+H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG-CO}_2\text{H+HO-PEG-}$$

Los entendidos en la técnica entienden que el término poli(etilenglicol) o PEG representa o incluye todas las formas conocidas en la técnica, incluso, entre otros, las divulgadas en el presente.

Muchos otros polímeros también son adecuados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, las estructuras poliméricas que son solubles en agua, de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en

la invención. Ejemplos de adecuados incluyen, entre otros, otros poli (alquilenglicoles), por ejemplo poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de los mismos (incluso, entre otros, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol), terpolímeros de los mismos, mezclas de los mismos y similares. Aunque el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede variar, éste está típicamente en el intervalo de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, con frecuencia de entre aproximadamente 6.000 Da y aproximadamente 80.000 Da. El peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica puede ser de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluso, entre otros, 100.000 Da, 95.000 Da, 90.000 Da, 85.000 Da, 80.000 Da, 75.000 Da, 70.000 Da, 65.000 Da, 60.000 Da, 55.000 Da, 50.000 Da, 45.000 Da, 40.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 25.000 Da, 20.000 Da, 15.000 Da, 10.000 Da, 9.000 Da, 8.000 Da, 7.000 Da, 6.000 Da, 5.000 Da, 4.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da y 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso

molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular de cada cadena de la estructura polimérica es de entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da.

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

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

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

X—A—POLY—B—N=N=N

en donde:

N=N=N es una fracción azida;

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

POLI es un polímero soluble en agua no antigénico;

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

X es un segundo grupo funcional.

Ejemplos de una fracción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1 y 10 átomos de carbono. Un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre se puede incluir con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 10, y puede contener entre 5 y 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen aquellos grupos de unión descritos en las patentes estadounidenses N.° 5.932.462; 5.643.575; y la publicación de patente estadounidense 2003/0143596, cada una de las cuales se incorpora al presente por referencia. Los entendidos en la técnica reconocerán que la lista

anterior para las fracciones de unión no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que todas las fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como adecuados para su uso en la presente invención.

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

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

Ejemplos específicos de grupos funcionales terminales en la bibliografía incluyen, entre otros, carbonato de N-succinimidilo (véase p. ej., patentes estadounidense N.° 5.281.698, 5.468.478), amina (véase p. ej., Buckmann y col. Makroniol, Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky y col. Eur.Polym. J. 19:1177 (1983)), hidrazida (Véase, p. ej., Andresz y col. Makromol. Chem. 179:301 (1978)), propionato de succinimidilo y butanoato de succinimidilo (véase, p. ej., Olson y col. en Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp

170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; véase también patente estadounidense N.° 5.672.662), succinato de succinimidilo (Véase, p. ej., Abuchowski y col. Cancer Biochem, Biophys. 7:175 (1984) y Joppich y col. Makromol. Chem. 180:1381 (1979), éster succinimidilo (véase, p. ej., patente estadounidense N.° 4.670.417), carbonato de benzotriazol (véase, p. ej., patente estadounidense N.° 5.650.234), éter glicidilo (véase, p. ej., Pitha y col. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling y col., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991), oxicarbonilimidazol (véase, p. ej., Beauchamp, y col., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli y col. J. Controlled Release 1:251 (1985)), carbonato de p-nitrofenilo (véase, p. ej., Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); y Sartore y col., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)), aldehído (véase, p. ej., Harris y col. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), patente estadounidense N.° 5.824.784, patente estadounidense N.° 5.252.714), maleimida (véase, p. ej., Goodson y col. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani y col. en Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)), y Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), ortopiridildisulfuro (véase, p. ej., Woghiren, y col. Bioconj. Chem. 4:314(1993)), acrilol (véase, p. ej., Sawhney y col., Macromolecules, 26:581 (1993)), vinilsulfona (véase, p. ej., patente estadounidense N.°

5.900.461). Todas las referencias y patentes se incorporan en el presente por referencia.

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

$$X\text{--}CH_2CH_2O\text{--}(CH_2CH_2O)_n\text{--}CH_2CH_2\text{–}N{=}N{=}N$$

en donde:

X es un grupo funcional como describe anteriormente; y

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000.

En otra realización, los derivados de polímeros de la invención comprenden una estructura polimérica que tiene la estructura:

$$X\text{—}CH_2CH_2O\text{--}(CH_2CH_2O)_n\text{--}CH_2CH_2\text{–}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}W\text{-}N{=}N{=}N$$

en donde:

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

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

X es un grupo funcional como se describe anteriormente, m está entre 1 y 10.

Los derivados de PEG que contienen azida de la invención se pueden preparar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente. En un método, que se muestra a continuación, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da,

dicha estructura polimérica tiene un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con un anión de azida (que puede estar emparejado con cualquiera de varios contraiones adecuados, incluyendo sodio, potasio, terc-butilamonio y así sucesivamente). El grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción azida, proporcionando el polímero de PEG que contiene azida deseado.

$$X\text{-}PEG\text{-}L + N_3^- \rightarrow X\text{-}PEG\text{-}N_3$$

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

En otro procedimiento para la preparación de los derivados de polímeros que contienen azida de la presente invención, un agente de unión que tiene una funcionalidad

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

A continuación se muestra un esquema de reacción ejemplar:

X-PEG-M + N-linker-N=N=N → PG-X-PEG-linker-N=N=N

en donde:

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

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

Ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, entre otros, M que es un ácido carboxílico, carbonato o éster activo si N es una amina; M que es una cetona si N es una fracción hidrazida o aminooxi; M que es un grupo saliente si N es un nucleófilo.

La purificación del producto en bruto se puede realizar a través de métodos conocidos incluso, entre otros, la

precipitación del producto seguido de cromatografía, si es necesario.

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

$$BocHN\text{-}PEG\text{-}NH_2 + HO_2C\text{-}(CH_2)_3\text{-}N{=}N{=}N$$

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

activados, ésteres activados y así sucesivamente, para la creación de reactivos heterobifuncionales valiosos.

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

En otra realización de la invención, el derivado de polímero tiene la estructura:

X—A—POLY—B—C≡C-R

en donde:

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

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

POLI es un polímero soluble en agua no antigénico;

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

X es un segundo grupo funcional.

Ejemplos de una fracción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 18, y puede contener entre 1 y 10 átomos de

carbono. Un heteroátomo, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre se puede incluir con la cadena alquilo. La cadena alquilo también puede estar ramificada en un heteroátomo. Otros ejemplos de una fracción de unión para A y B incluyen, entre otros, un grupo alquilo multifuncionalizado que contiene hasta 10, y puede contener entre 5 y 6 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido con uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Otros ejemplos de grupos de unión adecuados incluyen aquellos grupos de unión descritos en las patentes estadounidenses N.° 5.932.462 y 5.643.575; y la publicación de patente estadounidense 2003/0143596, cada una de las cuales se incorpora al presente por referencia. Los entendidos en la técnica reconocerán que la lista anterior para las fracciones de unión no es en absoluto exhaustiva y es meramente ilustrativa y que varias fracciones de unión que tienen las cualidades descritas anteriormente se contemplan como útiles en la presente invención.

Ejemplos de grupos funcionales adecuados para su uso como X incluyen, hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster activo, por ejemplo ésteres N-hidroxisuccinimidilo y ésteres 1-benzotriazolilo, carbonato activo, por ejemplo carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo y carbonatos de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa,

amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno, cetona y acetileno. Como se entenderá, la fracción X seleccionada debe ser compatible con el grupo acetileno para que la reacción con el grupo acetileno no ocurra. Los derivados de polímeros que contienen acetileno pueden ser homobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional (es decir, X) también es una fracción acetileno, o heterobifuncionales, lo que significa que el segundo grupo funcional es un grupo funcional diferente.

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

$$X—CH_2CH_2O\text{--}(CH_2CH_2O)_n\text{--}CH_2CH_2-O\text{-}(CH_2)_m\text{-}C\equiv CH$$

en donde:

X es un grupo funcional como describe anteriormente;

n es de aproximadamente 20 a aproximadamente 4000; y

m está entre 1 y 10.

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

Los derivados de PEG que contienen acetileno de la invención se pueden preparar mediante métodos conocidos para

los entendidos en la técnica o descritos en el presente. En un método, a continuación, una estructura polimérica soluble en agua que tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 100.000 Da, dicha estructura polimérica tiene un primer extremo terminal unido a un primer grupo funcional y un segundo extremo terminal unido a un grupo saliente adecuado, se hace reaccionar con compuesto que tiene tanto una funcionalidad acetileno como un grupo saliente que es adecuado para la reacción con el grupo nucleófilo en el PEG. Cuando el polímero de PEG que tiene la fracción nucleófila y la molécula que tiene el grupo saliente se combinan, el grupo saliente experimenta un desplazamiento nucleófilo y se reemplaza por la fracción nucleófila, proporcionando el polímero que contiene acetileno deseado:

X-PEG-Nu + L-A-C → X-PEG-Nu-A-C≡CR'

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

Ejemplos de Nu incluyen, entre otros, amina, alcoxi, ariloxi, sulfhidrilo, imino, carboxilato, hidrazida, aminoxi que reaccionarán principalmente a través de un mecanismo del tipo SN2. Ejemplos adicionales de grupos Nu incluyen los grupos funcionales que reaccionarán principalmente a través

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

En otra realización de la presente invención, A es un ligador alifático de entre 1 y 10 átomos de carbono o un anillo arilo sustituido de entre 6 y 14 átomos de carbono. X es un grupo funcional que no reacciona con grupos azida y L es un grupo saliente adecuado.

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

A continuación se muestra un esquema de reacción ejemplar:

X-PEG-L + -C≡CR' → X-PEG-C≡CR'

en donde:

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

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

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

La purificación del producto en bruto usualmente se puede realizar a través de métodos conocidos en la técnica incluso, entre otros, la precipitación del producto seguido de cromatografía, si es necesario.

Los polímeros solubles en agua se pueden unir a los polipéptidos de relaxina de la invención. Los polímeros solubles en agua se pueden unir mediante un aminoácido codificado no natural incorporado en el polipéptido de relaxina o cualquier grupo funcional o sustituyente de un aminoácido codificado no natural o natural, o cualquier grupo funcional o sustituyente añadido a un aminoácido codificado no natural o natural. Alternativamente, los polímeros solubles en agua se unen a un polipéptido de relaxina

incorporado en un aminoácido codificado no natural mediante un aminoácido natural (incluso, entre otros, cisteína, lisina o el grupo amina del residuo del terminal N). En algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aminoácidos no naturales, en donde uno o más aminoácidos codificados no naturales están unidos a polímeros solubles en agua (incluso, entre otros, PEG u oligosacáridos). En algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención comprenden adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos codificados naturales unidos a polímeros solubles en agua. En algunos casos, los polipéptidos de relaxina de la invención comprenden uno o más aminoácidos codificados no naturales unidos a polímeros solubles en agua y uno o más aminoácidos codificados naturales unidos a polímeros solubles en agua. En algunas realizaciones, los polímeros solubles en agua utilizados en la presente invención potencian la vida media sérica del polipéptido de relaxina en relación con la forma no conjugada.

El número de polímeros solubles en agua unidos a un polipéptido de relaxina (es decir, el alcance de la PEGilación o glicosilación) de la presente invención puede ajustarse para proporcionar una característica farmacológica, farmacocinética o farmacodinámica alterada (incluso, entre otros, aumentada o reducida) tal como vida media in vivo. En

algunas realizaciones, la vida media de la relaxina aumenta al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 por ciento, 2-veces, 5-veces, 6-veces, 7-veces, 8-veces, 9-veces, 10-veces, 11-veces, 12-veces, 13-veces, 14-veces, 15-veces, 16-veces, 17-veces, 18-veces, 19-veces, 20-veces, 25-veces, 30-veces, 35-veces, 40-veces, 50-veces o al menos aproximadamente 100-veces sobre un polipéptido no modificado.

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

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)m-O-NH2

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)m-X-NH-NH2

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

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

RO-(CH2CH2O)n -O-(CH2)m-NH-C(O)-NH-NH2

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

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)m-O-NH2

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)m-X-NH-NH2

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)m-NH-C(O)-NH-NH2

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

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

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

[RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)]2CH(CH2)m-X-NH-NH2

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

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

[RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-C(O)-NH-CH2-CH2]2CH-X-(CH2)m-NH-C(O)-NH-NH2

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

En algunas realizaciones, los derivados de PEG que contienen un grupo hidroxilamina tendrán la estructura:

[RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-C(O)-NH-CH2-CH2]2CH-X-(CH2)m-O-NH2

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

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

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

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

También pueden encontrarse métodos para activación de polímeros en WO 94/17039, patente estadounidense N.°

5.324.844, WO 94/18247, WO 94/04193, patente estadounidense N.° 5.219.564, patente estadounidense N.° 5.122.614, WO 90/13540, patente estadounidense N.° 5.281.698, y WO 93/15189, y para conjugación entre polímeros activados y enzimas incluyendo, entre otros, Factor de Coagulación VIII (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula transportadora de oxígeno (patente estadounidense N.° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App, Biochem. Biotech. 11: 141-52 (1985)). Todas las referencias y patentes se incorporan en el presente por referencia.

Se lleva a cabo PEGilación (es decir, adición de cualquier polímero soluble en agua) de polipéptidos de relaxina que contienen un aminoácido codificado no natural, por ejemplo p-azido-L-fenilalanina, a través de cualquier método conveniente. Por ejemplo, se PEGila polipéptido de relaxina con un derivado de mPEG terminado con alquino. Brevemente, se añade un exceso de mPEG(5000)-O-CH2-C□H sólido, con agitación, a una solución acuosa de polipéptido de relaxina que contiene p-azido-L-Phe a temperatura ambiente. Típicamente, la solución acuosa se tampona con un tampón que tiene una pKa cerca del pH al que se debe llevar a cabo la reacción (generalmente aproximadamente pH 4-10). Ejemplos de tampones adecuados para PEGilación a pH 7,5, por ejemplo, incluso, entre otros, HEPES, fosfato, borato, TRIS-

HCl, EPPS, y TES. El pH se controla continuamente y se ajusta si es necesario. Típicamente se permite que la reacción continúe durante aproximadamente 1-48 horas.

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

Si es necesario, el polipéptido de relaxina PEGilado obtenido de la cromatografía hidrófoba puede purificarse

adicionalmente por uno o más procedimientos conocidos por los entendidos en la materia incluso, entre otros, cromatografía de afinidad; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico (usando, incluso, entre otros, DEAE SEPHAROSE); cromatografía en sílice, HPLC de fase inversa; filtración en gel (usando, incluso, entre otros, SEPHADEX G-75); cromatografía de interacción hidrófoba; cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de quelato metálico; ultrafiltración/diafiltración; precipitación de etanol; precipitación de sulfato de amonio; cromatocentrado; cromatografía de desplazamiento; procedimientos electroforéticos (incluso, entre otros, centrado isoeléctrico preparatorio), solubilidad diferencial (incluyendo pero sin limitación precipitación de sulfato de amonio) o extracción. El peso molecular aparente se puede estimar por GPC por comparación con patrones de proteínas globulares (Preneta, AZ en PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). La pureza del conjugado de relaxina-PEG se puede evaluar por degradación proteolítica (incluso, entre otros, escisión con tripsina) seguido de análisis de espectrometría de masas. Pepinsky RB., y col., J. Pharmcol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001).

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

Derivados de PEG que contienen azida

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

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)m-N3

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

En otra realización, el derivado de PEG azido-terminal tendrá la estructura:

RO-(CH2CH2O)n -O-(CH2)m-NH-C(O)-(CH2)p-N3

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

En otra realización de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG ramificado que contiene una fracción azida terminal, con cada cadena del PEG ramificado que tiene un MW que varía de 10-40 kDa y puede ser de 5-

20 kDa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el derivado de PEG azido-terminal tendrá la siguiente estructura:

[RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)]2CH(CH2)m-X-(CH2)pN3

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

Derivados de PEG que contienen alquino

En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido de relaxina con un derivado de PEG que contiene una fracción alquino que reaccionará con una fracción azida presente en la cadena lateral del aminoácido codificado no natural.

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

RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)m-C□CH

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

En otra realización de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural que contiene alquino se modifica con un derivado de PEG que contiene una fracción azida terminal o alquino terminal que se une directamente a la estructura de PEG por medio de un enlace amida.

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

RO-(CH2CH2O)n -O-(CH2)m-NH-C(O)-(CH2)p-C≡CH

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

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

[RO-(CH2CH2O)n-O-(CH2)2-NH-C(O)]2CH(CH2)m-X-(CH2)p C≡CH

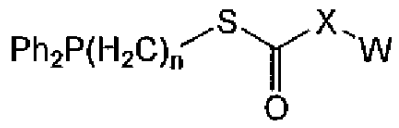
en donde R es un alquilo sencillo (metilo, etilo, propilo, etc.), m es 2-10, p es 2-10 y n es 100-1.000, y X es opcionalmente un O, N, S o grupo carbonilo (C=O), o no está presente.

Derivados de PEG que contienen fosfina

En otra realización de la invención, se modifica un polipéptido de relaxina con un derivado de PEG que contiene un grupo funcional activado (incluso, entre otros, éster, carbonato) que comprende adicionalmente un grupo fosfina que reaccionará con una fracción azida presente en la cadena lateral del aminoácido codificado no natural. En general, los

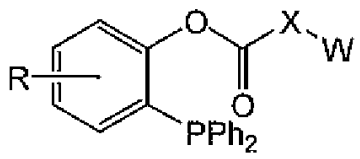
derivados de PEG tendrán un peso molecular medio que varía de 1-100 kDa y, en algunas realizaciones, de 10-40 kDa.

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



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

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



en done X puede ser O, N, S o no está presente, Ph es fenilo, W es un polímero soluble en agua y R puede ser H, alquilo, arilo, grupos alquilo sustituido y arilo sustituido. Grupos R ejemplares incluyen, entre otros, $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, -OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -C(O)R', -CONR'R", $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, -CN y $-NO_2$. R', R", R'" y R"" cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquil sustituido y no sustituido, aril sustituido y no sustituido, incluso, entre otros, aril sustituido por halógenos 1-3, alquil sustituido y no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los

grupos R se seleccionan de manera independiente como son cada uno de los grupos R’ R”, R’” y R”” cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R’ y R” están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5-, 6-, o 7-miembros. Por ejemplo, -NR’R” implica incluir, entre otros, 1-pirrolidinil y 4-morfolinil. Del análisis de sustituyentes anterior, el entendido en la técnica entenderá que el término “alquilo” implica incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos de hidrógeno, por ejemplo haloalquil (incluso, entre otros, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acil (incluso, entre otros, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ y similares).

Otros derivados de PEG y técnicas de PEGilación generales

Otras moléculas de PEG ejemplares que se pueden unir a polipéptidos de relaxina, así como métodos de PEGilación incluyen, entre otros, los descritos en, p. ej., publicación de patente estadounidense N.° 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171 2001/0044526; 2001/0021763; patente estadounidense N.° 6.646.110; 5.824.778; 5.476.653; 5.219.564 5.629.384;

5.736.625; 4.902.502; 5.281.698; 5.122.614; 5.473.034; 5.516.673; 5.382.657; 6.552.167; 6.610.281; 6.515.100; 6.461.603; 6.436.386; 6.214.966; 5.990.237; 5.900.461; 5.739.208; 5.672.662; 5.446.090; 5.808.096; 5.612.460; 5.324.844; 5.252.714; 6.420.339 6.201.072; 6.451.346; 6.306.821; 5.559.213; 5.747.646; 5.834.594; 5.849.860; 5.980.948; 6.004.573; 6.129.912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316, que se incorporan al presente por referencia. Cualquiera de las moléculas de PEG descritas en le presente se puede utilizar en cualquier forma, incluso, entre otros, cadena sencilla, cadena ramificada, cadena de múltiples ramas, funcional sencilla, bifuncional, multifuncional o cualquier combinación de las mismas.

Derivados de PEG y polímeros adicionales incluso, entre otros, derivados de PEG hidroxilamina (aminooxi), se describen en las siguientes solicitudes de patentes que se incorpora al presente por referencia en su totalidad:

publicación de patente estadounidense N.2006/0194256, publicación de patente estadounidense N.° 2006/0217532, publicación de patente estadounidense N.° 2006/0217289, patente provisional estadounidense N.° 60/755,338; patente provisional estadounidense N.° 60/755,711; patente provisional estadounidense N.° 60/755,018; solicitud de patente internacional N.° PCT/US06/49397; WO 2006/069246; patente provisional estadounidense N.° 60/743,041; patente provisional estadounidense N.° 60/743,040; solicitud de patente internacional N.° PCT/US06/47822; patente provisional estadounidense N.60/882,819; patente provisional estadounidense N.° 60/882,500; y patente provisional estadounidense N.° 60/870,594.

Proteínas de fusión Fc heterólogas

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

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

Hay cinco tipos de regiones Fc de inmunoglobulina humana con diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG es la

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

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

IgA puede existir tanto en forma monomérica y dimérica unidas por una cadena J. IgA es el segundo más abundante Ig en suero, pero tiene una vida media de solamente 6 días. IgA tienen tres funciones efectoras. Se une a un receptor específico de IgA en macrófagos y eosinófilos, que conduce fagocitosis y desgranulación, respectivamente. También puede fijar complemento a través de una vía alternativa desconocida.

IgM se expresa como un pentámero o un hexámero, que se mantienen Unidas por una cadena J. IgM tiene vida media sérica de 5 días. Se une débilmente a C1q a través de un sitio de enlace ubicado en su dominio CH3. IgM tiene vida media de 3 días en suero. No está claro qué funciones efectoras son atribuibles a Ig. IgE es una Ig monomérica y tiene una vida media sérica de 2,5 días. IgE se une a los receptores Fc que conducen la desgranulación y da como resultado la liberación de agentes proinflamatorios.

Dependiendo del efecto in vivo deseado, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isotipos descritos anteriormente o pueden contener regiones Fc mutadas en donde el complemento o las funciones del receptor de Fc se han alterado. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener toda la porción Fc de una inmunoglobulina, fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina o sus análogos fusionados a un compuesto interferón beta.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden consistir en proteínas de cadena sencillas o como polipéptidos de múltiples cadenas. Dos o más proteínas de fusión Fc se pueden producir de modo que interactúan a través de enlaces disulfuro que naturalmente se formar entre regiones Fc. Estos multímeros pueden ser homogéneos con

respecto al compuesto interferón beta o pueden contener diferentes compuestos interferón beta fusionados en el extremo amino terminal de la porción Fc de la proteína de fusión.

Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc o similar a Fc puede servir para prolongar la vida media plasma in vivo del compuesto interferón beta fusionado en el extremo amino terminal. Además, el componente interferón beta de un compuesto de proteína de fusión debe retener al menos una actividad biológica del interferón beta. Un aumento en la vida media terapéutica o circulante se puede demostrar utilizando el método descrito aquí o conocido en la técnica, en donde la vida media de la proteína de fusión se compara con la vida media del compuesto interferón beta solo. La actividad biológica se puede determinar a través de métodos in vitro e in vivo conocidos en la técnica.

Debido a que la región Fc de IgG producida por proteólisis tiene la misma vida media in vivo que la molécula de IgG intacta y los fragmentos Fab se degradan rápidamente, se cree que la secuencia relevante para prolongar la vida media se encuentra en los dominios CH2 o CH3. Además, se ha demostrado en la bibliografía que las tasas catabólicas de las variantes de IgG que no unen el receptor de Fc de alta afinidad o Clq son distinguibles de la tasa de eliminación

del anticuerpo natural, lo que indica que el sitio catabólico es diferente de los sitios implicados en la unión del receptor de Fc o Clq. [Wawrzynczak y col., (1992) Molecular Immunology 29:221]. Los estudios de mutagénesis de sitio dirigido que utilizan un región Fc de IgGl murina sugirieron que el sitio de la región Fc de IgGl que controla la tasa catabólica se ubica en la interfaz del dominio CH2-CH3. Las regiones Fc se pueden modificar en el sitio catabólico para optimizar la vida media de las proteínas de fusión. La región Fc utilizada para las proteínas de fusión de la presente invención se puede derivar de una IgGl o una región Fc de IgG4 y puede contener las regiones de CH2 y CH3, incluso la región bisagra.

Proteínas de fusión de albúmina heterólogas

La relaxina descrita en el presente se puede fusionar directamente o a través de un ligador peptídico, polímero soluble en agua o ligador profármaco a la albúmina o un análogo, fragmento o derivado de esta. Generalmente, las proteínas de albúmina que son parte de las proteínas de fusión de la presente invención se pueden derivar de la albúmina clonada de cualquier especie, incluso humana. La albúmina sérica humana (HSA) consiste en una cadena única de polipéptido single no glicosilado de 585 aminoácidos con un peso molecular de la fórmula de 66.500. La secuencia de aminoácidos de la HSA human se conoce [véase Meloun, y col.

(1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, y col. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, y col. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747, que se incorporan al presente por referencia]. Diversas variantes polimórficas así como análogos y fragmentos de albúmina se han descrito. [Véase Weitkamp, y col., (1973) Ann. Hum. Genet. 37:219]. Por ejemplo, en EP 322.094, varias formas más cortas de HSA. Algunos de estos fragmentos de HSA se divulgan, incluso HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369), y HSA(1-419) y los fragmentos entre 1 y 369 y entre 1 y 419. EP 399.666 divulga fragmentos de albúmina que incluyen HSA(1-177) y HSA(1-200) y los fragmentos entre HSA(1-177) y HSA(1-200).

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

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

Las proteínas de albúmina e inmunoglobulina naturales se pueden obtener de diversas fuentes. Por ejemplo, estas proteínas se pueden obtener de una genoteca de ADNc preparada a partir de un tejido o células que expresan el ARNm de interés a un nivel detectable. Las genotecas se pueden explorar con sondas diseñadas que utilizan la secuencia de proteínas o ADN publicada para la proteína particular de

interés. Por ejemplo, las regiones contantes de las cadenas ligera o pesada de inmunoglobulina se describen en Adams, y col. (1980) Biochemistry 19:2711-2719; Goughet, y col. (1980) Biochemistry 19:2702-2710; Dolby, y col. (1980) Proc, Natl. Acad. Sci. EUA 77:6027- 6031; Rice y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 79:7862-7862; Falkner, y col. (1982) Nature 298:286-288; y Morrison, y col. (1984) Ann. Rev. Immunol. 2:239-256. Algunas referencias que divulgan las secuencias de ADN y proteínas de albúmina incluyen Meloun, y col. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, y col. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, y col. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; y Minghetti, y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747.

Caracterización de las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención

Existen varios métodos para caracterizar las proteínas de fusión de la presente invención. Algunos de estos métodos incluyen, entre otros: SDS-PAGE acoplado con método de tinción de proteínas o inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-IgG o anti-HSA. Otros métodos incluyen desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas (MALDI-MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas, centrado isoeléctrico, intercambio aniónico analítico, cromatocentrado y dicroísmo circular, por ejemplo.

Potenciación de la afinidad para la albúmina sérica

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

Por ejemplo, en algunos casos, se realiza una fusión recombinante de un polipéptido de relaxina y una secuencia de unión a albúmina. Las secuencias de unión a albúmina ejemplares incluyen, entre otros, pero sin limitación, el dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptocócica (véase, p. ej., Makrides y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277:534-542 (1996) y Sjolander y col., J, Immunol. Methods 201:115-123 (1997)), o péptidos de unión a albúmina tales como los descritos en, p. ej., Dennis, y col., J. Biol. Chem. 277:35035-35043 (2002).

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

En otras realizaciones, los polipéptidos de relaxina de la invención se fusionan directamente con albúmina de suero (incluso, entre otros, albúmina sérica humana). Los entendidos en la técnica reconocerán que se pueden unir

también otras moléculas con relaxina en la presente invención para modular la unión a albúmina sérica u otros componentes del suero.

Glicosilación de polipéptidos de relaxina

La invención incluye polipéptidos de relaxina que incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales que portan residuos de sacáridos. Los residuos de sacáridos pueden ser naturales (incluso, entre otros, nacetilglucosamina) o no naturales (incluso, entre otros, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos también se pueden unir a los aminoácidos codificados no naturales por un enlace glucosídico ligado a N u O (incluso, entre otros, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (incluso, entre otros, una oxima o el glucósido correspondiente unido a C o S).

Las fracciones de sacárido (incluso, entre otros, glicosilo) se pueden añadir a polipéptidos de relaxina in vivo o in vitro. En algunas de las realizaciones de la invención, un polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural que contiene carbonilo se modifica con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxi para generar el polipéptido glicosilado correspondiente mediante un enlace de oxima. Una vez unido al aminoácido codificado no natural, el sacárido se puede elaborar adicionalmente por tratamiento con glicosiltransferasas y

otras enzimas para generar un oligosacáridos unido al polipéptido de relaxina. Véase, p. ej., H. Liu, y col. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003).

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

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

Dímeros y multímetros de relaxina

La presente invención también proporciona combinaciones de relaxina y análogos de relaxina, por ejemplo homodímeros, heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros (es decir, trímeros, tetrámeros, etc.) en las que al relaxina que

contiene uno o más aminoácidos codificados no naturales se une a otra relaxina o variante de relaxina del mismo o cualquier otro polipéptido que no sea relaxina o variante de relaxina del mismo, directamente a la estructura de polipéptidos o mediante un ligador. Debido a su peso molecular aumentado en comparación con los monómeros, los conjugados de dímero o multímero de relaxina pueden mostrar propiedades nuevas o deseables, incluso, entre otros, diferente vida media terapéutica farmacológica, farmacocinética, farmacodinámica, modulada o vida media en plasma modulada en relación con la relaxina monomérica. Para conocer ejemplos de análogos de relaxina monomérica véase, por ejemplo, Balschmidt, P., y col., patente estadounidense N.° 5.164.366, emitida el 17 de noviembre de 1992; Brange, J., y col., patente estadounidense N.° 5.618.913, emitida el 8 de abril de 1997; Chance, R. E., y col., patente estadounidense N.5.514.646, emitida el 7 de mayo de 1996; y Ertl, J., y col., EPO número de publicación 885,961, 23 de diciembre de 1998. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan análogos de relaxina monomérica que contienen uno o más residuos de aminoácidos codificados no naturales y en algunas realizaciones estos incluyen análogos de relaxina monomérica en donde la posición B28 es Asp, Lys, lie, Leu, Val o Ala y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro; análogo de relaxina monomérica con

Lys(B28)Pro(B29)-relaxina humana; análogo de relaxina monomérica Asp(B28)-relaxina humana; y análogo de relaxina monomérica Lys(B3)Ile(B28)-relaxina humana. En algunas realizaciones, los dímeros de relaxina de la invención modularán la transducción de señales del receptor de relaxina. En otras realizaciones, los dímeros o multímeros de relaxina de la presente invención actuarán como un antagonista, agonista o modulador del receptor de relaxina.

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

En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina se unen directamente, incluso, entre otros, mediante un enlace de amida Asn-Lys o enlace disulfuro Cys-Cys. En algunas realizaciones, los polipéptidos de relaxina, o la molécula unida no relaxina, comprenderán diferentes aminoácidos codificados no naturales para facilitar la dimerización, incluso, entre otros, un alquino en un aminoácido codificado no natural de un primer polipéptido de relaxina y una azida en un segundo aminoácido codificado no natural de una segunda molécula se conjugará mediante una cicloadición de Huisgen [3+2]. Alternativamente, la relaxina, o la molécula unida no relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural que contiene cetona se puede conjugar

con un segundo polipéptido que comprenda un aminoácido codificado no natural que contiene hidroxilamina y se hace reaccionar a los polipéptidos mediante formación de la oxima correspondiente.

Alternativamente, los dos polipéptidos de relaxina o la molécula unida no relaxina, se unen mediante un ligador. Se puede utilizar cualquier ligador hetero u homobifuncional para unir las dos moléculas, o moléculas unidas no relaxina, que pueden tener la misma o diferentes secuencias primarias. En algunos casos, el ligador utilizado para ligar la relaxina o las moléculas unidas no relaxina entre sí puede ser un reactivo de PEG bifuncional. El ligador puede tener un amplio intervalo de pero molecular o longitud molecular. Se pueden utilizar ligadores de peso molecular mayor o menor para proporcionar una relación o conformación espacial deseada entre la relaxina y la entidad unida o entre relaxina y su receptor, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera. También se pueden utilizar ligadores que tienen longitud molecular más larga o más corta para proporcionar un espacio o flexibilidad deseados entre la relaxina y la entidad unida, o entre la entidad unida y su compañero de unión, si lo hubiera.

En algunas realizaciones, la invención proporciona ligadores bifuncionales solubles en agua que tienen una estructura en forma de mancuerna que incluyen: a) una

fracción que contiene azida, alquino, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o carbonilo en al menos un primer extremo de una estructura polimérica; y b) al menos un segundo grupo funcional en un segundo extremo de la estructura polimérica. El segundo grupo funcional puede ser el mismo diferente del primer grupo funcional. El segundo grupo funcional, en algunas realizaciones, no es reactivo con el primer grupo funcional La invención proporciona, en algunas realizaciones, compuestos solubles en agua que comprenden al menos una rama de una estructura molecular ramificada. Por ejemplo, la estructura molecular ramificada puede se dendrítica.

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

R-(CH2CH2O)n-O-(CH2)m-X

en donde n es de aproximadamente 5 a 3.000, m es 2-10, X puede ser un grupo azida, alquino, hidrazina, hidrazida, aminooxi, una fracción que contiene hidroxilamina, acetilo o carbonilo y R es un grupo protector, un grupo funcional o un grupo saliente que puede ser el mismo o diferente que X. R puede ser, por ejemplo, un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo, hidroxilo protegido, alcoxilo, éster N-hidroxisuccinimidilo, éster 1-benzotriazolilo, carbonato de N-hidroxisuccinimidilo,

carbonato de 1-benzotriazolilo, acetal, aldehído, aldehído hidratos, alquenilo, acrilato, metacrilato, acrilamida, sulfona activa, amina, aminooxi, amina protegida, hidrazida, hidrazida protegida, tiol protegido, ácido carboxílico, ácido carboxílico protegido, isocianato, isotiocianato, maleimida, vinilsulfona, ditiopiridina, vinilpiridina, yodoacetamida, epóxido, glioxales, dionas, mesilatos, tosilatos, tresilato, alqueno y cetona.

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

La actividad del polipéptido de relaxina se puede determinar utilizando ensayos in vitro o in vivo estándar o conocidos. Los polipéptidos de relaxina se pueden analizar para conocer la actividad biológica a través de método adecuados conocidos en la técnica. Dichos ensayos incluyen, entre otros, la activación de genes que responden a interferón, ensayos de unión al receptor, ensayos de actividad anti-virales, ensayos de inhibición del efecto citopático, (Familletti y col., Meth. Enzymol. 78:387-394), ensayos anti-proliferativos, (Aebersold y Sample, Meth. Enzymol. 119:579-582), ensayos inmunomoduladores (patentes estadounidenses N.° 4.914.033; 4.753.795), y ensayos que controlan la inducción de moléculas MHC (p. ej., Hokland y

col., Meth. Enzymol. 119:688-693), como se describe en Meager, J. Immunol. Meth., 261:21-36 (2002).

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

Ensayo de Transporte de Glucosa-Dependiente de relaxina. La captación de Hexosa, como se ensayó por la acumulación de 0,1 mM 2-desoxi-D-[14C]glucosa, se mide de la siguiente manera: se lavan edipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos dos veces con tampón KRP (136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM NaPO4, 0,9 mM CaCl2, 0,9 mM MgS04, pH 7,4) calentado a 37 °C y que contiene BSA al 0,2 %, se incuban en medio L-15 de Leibovitz que contiene BSA al 0,2% durante 2 horas a 37 °C en aire ambiente, se lavan dos veces nuevamente con tampón KRP que contiene BSA al 0,2% y se incuban en tampón KRP, BSA al 0,2% en ausencia (solamente Me2SO) o presencia de wortmanina durante 30 minutos a 37 °C en aire ambiente. Después se añade relaxina a una concentración final de 100 nM durante 15 minutos y se mide la captación de 2-desoxi-D-[14C]glucosa durante los últimos 4 minutos. Se resta la captación no específica, medida en presencia de citocalasina 10 µM citocalasina B, de todos los valores. Las concentraciones de proteínas se determinan con el ensayo de ácido biciconínico de Pierce. La captación se mide de forma rutinaria por triplicado o cuadruplicado para cada experimento. Puede investigarse el efecto del pretratamiento agudo y crónico de adipocitos 3T3-L1 con FGF-21 en presencia de relaxina.

Ensayo de Transporte de Glucosa-Independiente de relaxina. Se siembran fibroblastos 3T3-L1 en placas de 96

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

En el modelo de transporte de glucosa ex vivo, el ensayo de transporte de glucosa se describe como sigue: Soluciones Madre de Tampón de Krebs-Henseleit. Solución madre 1: NaCl (1,16 M); KCl (0,046 M); KH2PO4 (0,0116 M); NaHCO3 (0,0253 M). Solución madre 2: CaCl2 (0,025 M); MgSO4 (2H2O)(0,0116 M). BSA: Usar Fracción V de Cohn de ICN, BSA sin ácidos grasos directamente sin dializar. Preparación de Medio: añadir 50 ml de solución madre de Krebs de 1 a 395 ml de dH2O y gas con O2 al 95 %/CO2 al 5 % durante 1 hora.

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

HCl 1 N, después se mezcla bien Se ponen después 200 µl de sobrenadante en viales de centelleo duplicados y se cuentan en un contador de centelleo en comparación con patrones radiactivos conocidos.

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

Las cantidades e relaxina promedio, polipéptidos de relaxina o análogos de relaxina de la presente invención pueden variar y en particular se deben basar en las recomendaciones y prescripción de un médico calificado. La cantidad de relaxina exacta, lopipéptidos de relaxina o análogos de relaxina de la presente invención es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto o gravedad de la afección que se trata, la condición del

paciente que se tata así como los otros ingredientes en la composición. La invención también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. La cantidad que se administrará puede ser fácilmente determinada por un entendido en la técnica en base a la terapia con relaxina, terapias con relaxina disponibles u otros análogos de relaxina.

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

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1

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

Las figuras 1-4 muestran la estructura y la secuencia de relaxina y la tabla a continuación incluye secuencias con la cadena A, cadena B, relaxina y prorrelaxina. Se generaron polipéptidos de relaxina mediante la sustitución de un aminoácido codificado natural por un aminoácido codificado no natural. Se sustituyó en cada polipéptido uno de los aminoácidos por para-acetil fenilalanina (pAcF o pAF). Los

polipéptidos generados carecían de la secuencia líder y eran polipéptidos de relaxina de cadena A/B (SEQ ID N.° 1-3). Cada uno de los polipéptidos generados tenía una sustitución de aminoácido codificado no natural en una de las siguientes posiciones 1,5, 18, 13, 2 de SEQ ID N.°: 4 o en esas posiciones de la cadena A de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas o 5, 7, 18, 28 de SEQ ID N.°: 5 o 6 en esas mismas posiciones de la cadena B de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas. La figura 2 muestra la estructura de la relaxina humana que se marcó utilizando el software PyMOL (DeLano Scientific; Palo Alto, CA) y algunos aminoácidos correspondientes a los sustituidos por para-acetil fenilalanina en los polipéptidos de relaxina de la invención.

Otro conjunto de criterios para la selección de sitios de incorporación de aminoácidos codificados no naturales incluye utilizar y comparar las estructuras cristalinas del Protein Data Bank, o de otros bancos de datos, que se utilizan para modelar la estructura de la relaxina y se identifican residuos que 1) no interferirían con la unión al receptor y 2) no estarían presentes en el interior de la proteína. En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales, entre otras, en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 18, 13, 2 de SEQ ID N.°: 4 o en esas posiciones de la cadena A de

cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas o 5, 7, 18, 28 de SEQ ID N.°: 5 o 6 o en esas mismas posiciones de la cadena B de cualquiera de las secuencias de relaxina conocidas.

Se utilizaron los siguientes criterios para evaluar cada posición de la relaxina y de los análogos de relaxina para la introducción de un aminoácido codificado no natural: el residuo (a) no debería interferir con la unión del receptor según el análisis estructural, b) no debería verse afectado por la mutagénesis por barrido con alanina u homólogo (c) debería ser de superficie expuesta y presentar interacciones de enlace de hidrógeno o van der Waals mínimas con residuos circundantes, (d) debería ser eliminado o variable en las variantes de relaxina, (e) provocaría cambios conservadores tras la sustitución por un aminoácido codificado no natural (f) se podría encontrar en cualquiera de las regiones altamente flexibles o regiones estructuralmente rígidas. Además, se pueden realizar más cálculos sobre la molécula de relaxina utilizando el programa Cx (Pintar y col. (2002) Bioinformatics, 18, pp 980) para evaluar el grado de protuberancia para cada átomo de la proteína.

En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la cadena A de relaxina: antes de la

posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEQ ID N.°: 4 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1-3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la cadena B de relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína) (SEQ ID N.°: 5 o 6 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 1-3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NOs: 2 y 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NOs: 2 y 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID

NOs: 2 y 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NOs: 2 y 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 1, 5, 31, 2, 13 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NOs: 2 y 3). En algunas realizaciones, se incorporan uno o más aminoácidos codificados no naturales en una o más de las siguientes posiciones en la relaxina: 5, 31, 2, 13 (SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID NOs: 2 y 3).

Ejemplo 2

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

Los métodos para clonar la relaxina son conocidos por los entendidos en la técnica. Las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos para la relaxina y para clonar la relaxina en células huésped se describen en la patente estadounidense N.° 4.758.516; la patente estadounidense N.° 5.166.191; la patente estadounidense N.° 5.179.195, 5.945.402; y 5.759.807; las cuales se incorporan al presente por referencia.

El ADNc que codifica la relaxina se muestra como SEQ ID N.°: 12 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se muestra como SEQ ID N.°: 1.

TABLA 1: Secuencias de relaxina citadas

SEQ ID N.°:	Nombre de secuencia	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de relaxina	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	Secuencia de aminoácidos de relaxina B1 Ala	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	Secuencia de aminoácidos de prorrelaxina	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
4	Secuencia de aminoácidos de cadena A de relaxina	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	Secuencia de aminoácidos de cadena B de relaxina	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	Secuencia de aminoácidos de cadena B de relaxina con B1 Ala	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	Secuencia de aminoácidos de péptido C	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	Secuencia de aminoácidos líder de relaxina	MKKNIAFLLKR
9	Secuencia de	MIEGGR

	aminoácidos líder de insulina	
10	Secuencia de ácidos nucleicos de cadena A de relaxina	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaagatctct tgctagattttgc
11	Secuencia de ácidos nucleicos de cadena B de relaxina	gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagat tgccatttgcggcatgagcacctggagc

12	Secuencia de ácidos nucleicos de cadena A y B de relaxina	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaag atctcttgctagattttgcgactcatggatggaggaagttattaaattatgcg gccgcgaattagttcgcgcgcagattgccatttgcggcatgagcacctggagc
13	Secuencia de ácidos nucleicos líder de relaxina	atgaaaaagaatatcgcatttcttcttaaacgg
14	Secuencia de ácidos nucleicos líder de insulina	atgattgaaggtggtcgt
15	Ejemplo de una secuencia de aminoácidos de construcción de expresión de relaxina	M I E G G R D S W M E E V I K L C G R E L V R A Q I A I C G M S T W S R R E A E D L Q V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L E G S L Q K R Q L Y S A L A N K C C H V G C T K R S L A R F C

Un sistema de traducción introducido que comprende un ARNt ortogonal (O-ARNt) y una aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal (O-RS) se utiliza para expresar la relaxina o análogos de relaxina que contienen un aminoácido codificado no natural. La O-RS preferentemente aminoacila el O-ARNt con un aminoácido codificado no natural. A su vez, el sistema de traducción inserta al aminoácido codificado no natural en la relaxina o análogo de relaxina, en respuesta a un codón

selector codificado. Se describen secuencias adecuadas de O-RS y O-ARNt en WO 2006/068802 titulada "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof" (E9; SEQ ID N.°: 16) y WO 2007/021297 titulada "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (F13; SEQ ID N.°: 17), que se incorporan al presente por referencia en su totalidad.

TABLA 2: Secuencias citadas

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

La transformación de E. coli con plásmidos que contienen gen del análogo de relaxina o relaxina modificada y el par aminoacil-ARNt sintetasa ortogonal/ARNt (específico

para el aminoácido codificado no natural deseado) permite la incorporación específica del sitio del aminoácido codificado no natural en el polipéptido de relaxina.

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

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

Supresión con para-acetil fenilalanina (pAcF)

Se utilizaron plásmidos (p. ej., pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381)) para transformar en la

cepa W3110B57 de Escherichia coli para producir la cepa RLX-BA1-AV13pAFW3110B2 de E. coli en donde la expresión de la polimerasa T7 fue controlada por un promotor inducible por arabinosa. Se diluyeron los cultivos bacterianos producidos durante la noche 1:100 en matraces de agitación que contenían 2X medio de cultivo YT y se cultivaron a 37°C a un OD_{600} de ~0,8. Se indujo la expresión de la proteína por el añadido de arabinosa (0,2% final) y para-acetil fenilalanina (pAcF) hasta una concentración final de 4 mM. Se incubaron los cultivos a 37°C durante 5 horas. Se sedimentaron las células y se resuspendieron en tampón de lisis B-PER (Pierce) 100ul/OD/ml + 10ug/ml DNasa y se incubaron a 37°C durante 30 min. Se extrajo el material celular por centrifugación y se extrajo el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en una cantidad igual de tampón de carga de proteína SDS-PAGE. Se cargaron todas las muestras en un gel PAGE 4-12% con MES y DTT. Los métodos para purificar la relaxina son conocidos por los entendidos en la técnica y se confirmaron por SDS-PAGE, análisis de transferencia Western o espectrometría de masas de barrera iónica de ionización por electroaspersión, y similares.

Las proteínas de relaxina mutantes marcadas con His se pueden purificar utilizando métodos conocidos por los entendidos en la técnica. Se puede utilizar la Nickel-Chelating Resin ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) a través

de los procedimientos estándar de purificación de proteínas marcadas con His proporcionados por el fabricante. Las mediciones funcionales de las proteínas se pueden realizar a través de métodos conocidos en la técnica, los métodos proporcionados por la presente invención y las referencias incorporadas, y alternativamente se puede desarrollar un ELISA sobre células vivas para evaluar los polipéptidos de relaxina de la invención.

TABLA 3: Análisis de variantes de relaxina

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

	NR migra entre los estándares 49 y 38 kDa MW				

5K V13pAF[1,3] PEGilado	Banda principal NR migra cerca del estándar 14 kDa MW	5,4	1,5	99,4%	99,8%
10K V13pAF[1,3] PEGilado	Banda principal NR migra entre los estándares 28 y 17 kDa MW	9,8	1,8	99,4%	99,5%
20K V13pAF[1,3] PEGilado	Banda principal NR migra entre los estándares 49 y 38 kDa MW	4,7	1,9	99,0%	99,5%
30K V13Paf[1,3] PEGilado	Banda principal NR migra entre los estándares 62 y 49 kDa MW	8,0	2,1	99,5%	99,8%

Muestras no reducidas (NR); NT = no evaluado

[1] sustitución pAcF ubicada en cadena A

[2] sustitución pAcF ubicada en cadena B

[3] sustitución Asp a Ala en cadena B (BA1)

[4] utilizado para PK inicial

TABLA 4: Pérdida de actividad de variante de relaxina

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

		30K	26,8(30K)				SE- HPLC
RLX-A-AQ1	12	20K	10,7	20K muestra eficacia	sí	720 mg/L	SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL, SE- HPLC
RLX-A-AA5	12	20K	12,2		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A-BV7	15	20K	13,1		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-A-AL2	17	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BE5	17	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-AR18	21	20K	12,5		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL
RLX-BE5	22	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BA18	48	20K			sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC
RLX-A-BW28	48	20K	13,9		sí		SDS-PAGE, conc., RP-HPLC, LAL

Ejemplo 3

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

Prorrelaxina expresada por *E.coli* como una proteína de cadena única compuesta por 88 aminoácidos. Tras la digestión con tripsina y carboxipeptidasa, se extraen un péptido conector y una secuencia líder. El péptido resultante es un péptido de cadena doble pequeño de 6 kDa miembro de la superfamilia de insulina que consiste en una cadena A de 24 residuos y una cadena B de 29 residuos. El pliegue estructural se caracteriza por dos cadenas peptídicas que se mantienen juntas por dos enlaces disulfuro intercadena

(Cys11-Cys36 y Cys24-Cys48) y un enlaces disulfuro intracadena (Cys10-Cys15). La estructura terciaria basada en una estructura cristalina de relaxina-2 humana reveló un pliegue compacto que comprende tres segmentos helicoidales y una región extendida corta que comprende un núcleo hidrofóbico.

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

Ejemplo 4

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

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

En otra realización de la presente invención, se producen al menos 6 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 8 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 10 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 15 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular. En otra realización de la presente invención, se producen al menos 20 g de proteína de relaxina por cada litro de cultivo celular.

2.1 Matraces de agitación y siembra

Se utilizó la cepa W3110B57 de Escherichia coli [F-IN(rrnD-rrnE) lambda-araB::gl tetA fhuA::dhfr ompT::cat] que alberga al plásmido pt_RLX_BA1_AV13am_p1395 (AXID2381) para producir RLX-BA1-AV13pAF. Se extrajo un único frasco de banco celular de investigación (RCB) de -80°C y se descongeló a temperatura ambiente, después se utilizaron 50 µL para inocular 50 µL de medio de siembra (un medio químicamente definido) complementado con 50 µg/mL sulfato de kanamicina en un matraz de Erlenmeyer inclinado de 250 mL. Se cultivó el cultivo de siembra primario durante aproximadamente 18 horas a 37 °C y 250 rpm (perno de 1 pulgada). Se subcultivó el cultivo de siembra primario en un cultivo de siembra secundario a una densidad óptica medida a una longitud de

onda de 600 nm (OD600) de 0,05 en un matraz de Erlenmeyer inclinado de 500 mL que contenía 100 mL de medio de siembra complementado con 50 µg/mL sulfato de kanamicina. Se cultivó el cultivo de siembra secundario a 37 °C y 250 rpm (perno de 1 pulgada) durante aproximadamente 8 horas o cuando la OD600 llegó a entre 2 y 4.

2.2 Fermentadores

Se llenaron recipientes de 5-L Sartorius Biostat B con 2,1-L de medio de producción (un medio químicamente definido) complementado con 50 µg/L de sulfato de kanamicina. Los cultivos de siembra secundarios se utilizaron para inocular los fermentadores a una OD600 inicial de 0,035. Se cultivaron los cultivos a 37 °C y el oxígeno disuelto se fijó para mantener el 30% (saturación de aire) con una cascada de agitación primaria (480 - 1200 rpm) y una cascada secundaria de O2. Un caudal de aire de 5 LPM con contrapresión de 6 psi se mantuvo durante la fermentación. El pH del cultivo se fijó en 7,2 ± 0,05 con el añadido de hidróxido de amonio al 15% y se añadió antiespumante Dow Chemical P2000 según fue necesario para el control de la espuma. Cuando el cultivo alcanzó una OD600 de entre 35 ± 5 (cuando casi se había agotado el glicerol inicial en el medio de cultivo discontinuo), se inició una alimentación por bolo de 200 mL y al mismo tiempo el punto de ajuste de pH se ajustó de 7,2 a 6,6. Después de la alimentación por bolo inicial, se inició

un a alimentación continua a una tasa de 0,25 mL/L/min y se continuó hasta la cosecha. Inmediatamente después de iniciar la alimentación, se añadieron 2,5 mL/L (0,2 g/L volumen de cultivo final) de una solución dipeptídica de L-Ala-pAcF 100 g/L preparada en agua al fermentador. Quince minutos después del añadido del dipéptido, se indujo el cultivo mediante el añadido de L-arabinosa (receta proporcionada en PTR-FGF-002) a una concentración de 2 g/L (volumen de cultivo final). Se cultivó el cultivo durante 6 horas después del añadido de arabinosa y se cosechó.

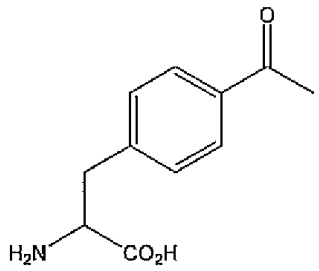
La figura 5 muestra un gel de SDS-PAGE de la prorrelaxina producida mediante estos métodos con un aminoácido de la cadena B1 como Ala y una para-acetil fenilalanina en la 13ª posición de aminoácido de la cadena A, sustituido por valina.

Ejemplo 5

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

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxilo de aproximadamente 5.000 MW. Cada uno de los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 3, 5, 7, 9, 11) y cada uno de los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 2 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 4, 6, 8, 10, 12) se sustituye por separado por un aminoácido codificado no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-acetil fenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 1 y 2 (cadenas A y B de relaxina) y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y 15, 29, 30 o 31 (TyrRS LW1, 5 o 6) descritas en el ejemplo 2 anterior.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

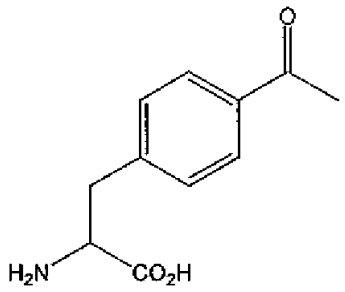
en donde R es metil, n es 3 y N es aproximadamente 5.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina disuelta a 10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a 100 de PEG que contiene aminooxilo y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 6

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

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

terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o los aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 4 y 5 o 6 (cadenas A y B de relaxina) y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

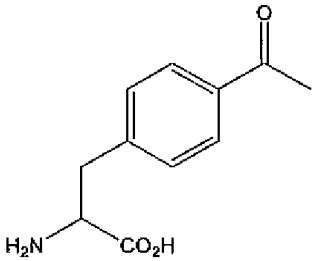
en donde R es metil, n es 3 y N es aproximadamente 20.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis,

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

Ejemplo 7

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

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



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 13 y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

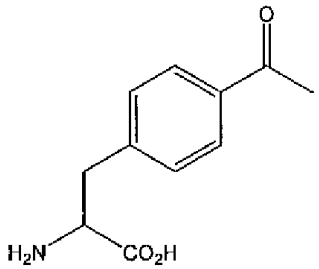
R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

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

Ejemplo 8

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

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



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 1 y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M.

jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

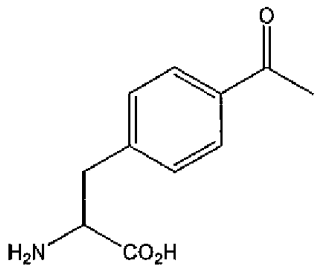
en donde R es metil, n es 3 y N es aproximadamente 20.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO)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

Ejemplo 9

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

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado no natural que contiene cetona que posteriormente

se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxilo de aproximadamente 30.000 MW. Cada uno de los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 1 (o SEQ ID N.°: 2 o 3) y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

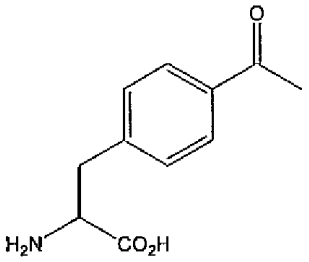
en donde R es metil, n es 3 y N es aproximadamente 30.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO)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

Ejemplo 10

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

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado no natural que contiene cetona que posteriormente se hace reaccionar con un PEG que contiene aminooxilo de aproximadamente 40.000 MW. Cada uno de los residuos antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo

terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones de aminoácidos correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3) se sustituye por separado por un aminoácido codificado no natural que tiene la siguiente estructura:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 13 (o SEQ ID N.°: 1, 2 o 14) y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

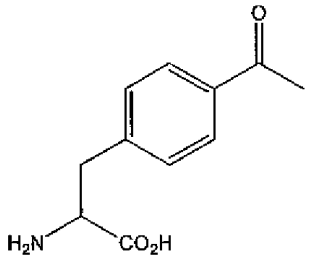
en donde R es metil, n es 3 y N es aproximadamente 40.000 MW. La relaxina purificada que contiene p-aminofenilalanina disuelta a 10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 10 a

100 de PEG que contiene aminooxilo y después se agita durante 10 a 16 horas a temperatura ambiente (Jencks. W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475). Se diluye el PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 11

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

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



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina en la relaxina son SEQ ID N.°: 13 (o las posiciones correspondientes en SEQ ID N.°: 1, 2 o 14) y SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y las secuencias descritas anteriormente e incorporadas para la incorporación específica del sitio de p-aminofenilalanina.

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

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

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

PEG-relaxina en un tampón adecuado para la purificación inmediata y el análisis.

Ejemplo 12

Conjugación con un PEG que consiste en un grupo hidroxilamina unido al PEG a través de un enlace amida.

Un reactivo de PEG que tiene la siguiente estructura está acoplado a un aminoácido codificado no natural que contiene cetona utilizando el procedimiento descrito en los ejemplos 3-9:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_n\text{-}O\text{-}NH_2$$

en donde R = metil, n=4 y N es aproximadamente 5.000 MW - 40.000 MW. Las condiciones de reacción, purificación y análisis son como se describió y como se conoce en la técnica.

Ejemplo 13

Este ejemplo detalla la introducción de dos aminoácidos codificados no naturales diferentes en polipéptidos de relaxina y polipéptidos de análogo de relaxina.

Este ejemplo demuestra un método para la generación de un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido codificado no natural que comprende una funcionalidad cetona en dos posiciones entre los siguientes residuos: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3). El polipéptido de relaxina se prepara como se describió anteriormente, con la diferencia de que el codón selector se introduce en dos sitios diferentes dentro del ácido nucleico.

Ejemplo 14

Este ejemplo detalla la conjugación del polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina con un PEG que contiene hidrazida y reducción in situ posterior.

Un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo se prepara de acuerdo con el procedimiento que se describió anteriormente. Una vez modificado, un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura se conjuga con un polipéptido de relaxina:

R-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)n-X-NH-NH2

en donde R = metil, n=2 y N = 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; o 40.000 MW y X es un grupo carbonilo (C=0). La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina se disuelve a entre 0,1-10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 1 a

100 de PEG que contiene hidrazida, y la hidrazona correspondiente se reduce in situ mediante el añadido de solución madre 1M NaCNBH3 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), se disuelve en H_2O hasta una concentración final de 10-50 mM. Las reacciones se realizan en la oscuridad a 4 °C a RT durante 18-24 horas. Se detienen las reacciones mediante el añadido de 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris de 50 mM o se diluye en tampón adecuado para la purificación inmediata.

Ejemplo 15

Este ejemplo detalla la conjugación del polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina con un PEG que contiene hidrazida y reducción in situ posterior.

Un polipéptido de relaxina que incorpora un aminoácido que contiene carbonilo se prepara de acuerdo con el procedimiento que se describió anteriormente. Una vez modificado, un PEG que contiene hidrazida que tiene la siguiente estructura se conjuga con un polipéptido de relaxina:

R-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)n-X-NH-NH2

en donde R = metil, n=2 y N = 20.000 MW y X es un grupo carbonilo (C=O). La relaxina purificada que contiene p-acetil fenilalanina se disuelve a entre 0,1-10 mg/mL en 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma

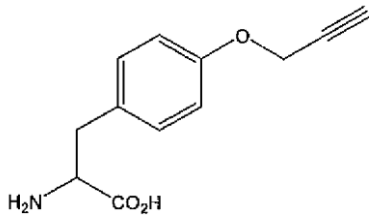
Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 o en 10 mM acetato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, se hace reaccionar con un exceso de veces de 1 a 100 de PEG que contiene hidrazida, y la hidrazona correspondiente se reduce in situ mediante el añadido de solución madre 1M NaCNBH3 (Sigma Chemical, St. Louis, MO), se disuelve en H2O hasta una concentración final de 10-50 mM. Las reacciones se realizan en la oscuridad a 4 °C a RT durante 18-24 horas. Se detienen las reacciones mediante el añadido de 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a aproximadamente pH 7,6 hasta una concentración final de Tris de 50 mM o se diluye en tampón adecuado para la purificación inmediata.

Ejemplo 16

Este ejemplo detalla la introducción de un aminoácido que contiene alquino en un polipéptido de relaxina o polipéptido de análogo de relaxina y la derivación con mPEG-azida.

Los siguientes residuos, antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID

N.°: 2 y 3) se sustituyen cada uno por el siguiente aminoácido codificado no natural:



Las secuencias utilizadas para la incorporación específica del sitio de p-propargil-tirosina en la relaxina son SEQ ID N.°: 1 (o las posiciones correspondientes en SEQ ID N.°:2 o 3), SEQ ID N.°: 16 o 17 (ARNtmut, M. jannaschii) y 22, 23 o 24 descritas anteriormente. El polipéptido de relaxina que contiene la propargil tirosina se expresa en E. coli y se purifica utilizando las condiciones descritas anteriormente.

La relaxina purificada que contiene propargil-tirosina se disuelve a entre 0,1-10 mg/mL en tampón PB (100 mM fosfato de sodio, 0,15 M NaCl, pH = 8) y se añade un exceso de veces de 10 a 1000 de un PEG que contiene azida a la mezcla de reacción. Después, se añaden una cantidad catalítica de CuSO4 y alambre de Cu a la mezcla de reacción. Después de incubar la mezcla (incluso, entre otros, aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente o 37 °C, o durante la noche a 4°°C), se añade H2O y se filtra la mezcla a través de una membrana de diálisis. Se puede analizar la mezcla para la adición, incluso, entre otros, mediante procedimientos similares

descritos en el ejemplo 3. En este ejemplo, el PEG tendrá la siguiente estructura:

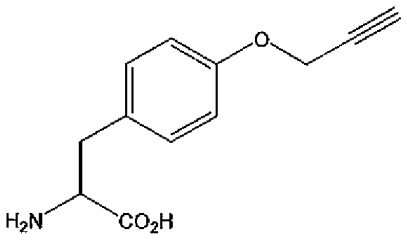
R-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)n-N3

en donde R es metil, n es 4 y N = 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; o 40.000 MW.

Ejemplo 17

Este ejemplo detalla la sustitución de un aminoácido hidrofóbico grande en un polipéptido de relaxina por propargil tirosina.

Un residuo Phe, Trp o Tyr presente dentro de una de las siguientes regiones de la relaxina: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3) se sustituye por el siguiente aminoácido codificado no natural como se describió anteriormente:



Una vez modificada, se una un PEG a la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene alquino. El PEG tendrá la siguiente estructura:

Me-PEG(N)-O-(CH2)2-N3

y los procedimientos de acoplado seguirían los de los ejemplos anteriores. Esto generará una variante del polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural que es aproximadamente isostérica con una de los aminoácidos hidrofóbicos naturales grandes y que está modificada con un derivado de PEG en un sitio diferente dentro del polipéptido.

Ejemplo 18

Este ejemplo detalla la generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina separado por uno o más ligadores de PEG. Se pueden formar multímeros del polipéptido de relaxina entre las proinsulinas o entre los polipéptidos de relaxina de cadena A y B maduros de la invención.

La variante del polipéptido de relaxina que contiene alquino producida en el ejemplo anterior se hace reaccionar con un derivado de PEG bifuncional de la forma:

N3-(CH2)n-C(O)-NH-(CH2)2-O-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)-(CH2)n-N3

en donde n es 4 y el PEG tiene un MW promedio de aproximadamente 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar el homodímero del polipéptido de relaxina

correspondiente en donde las dos moléculas de relaxina están separadas físicamente por PEG. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 19

Este ejemplo detalla la generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina separado por uno o más ligadores de PEG. Se pueden formar multímeros del polipéptido de relaxina entre las cadenas A y otras cadenas A o cadenas B y otras cadenas B.

La variante del polipéptido de relaxina que contiene alquino producida en el ejemplo anterior se hace reaccionar con un derivado de PEG bifuncional de la forma:

N3-(CH2)n-C(O)-NH-(CH2)2-O-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)-(CH2)n-N3

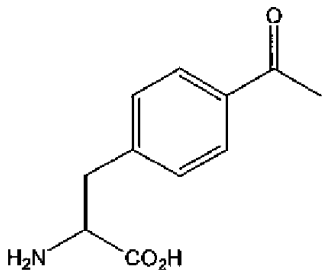
en donde n es 4 y el PEG tiene un MW promedio de aproximadamente 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar el homodímero del polipéptido de relaxina correspondiente en donde las dos moléculas de relaxina están separadas físicamente por PEG. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o

heteromultímeros. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizarán como en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 20

Este ejemplo detalla el acoplamiento de una fracción sacárida a un polipéptido de relaxina.

Un residuo de los siguientes se sustituye por el aminoácido codificado no natural a continuación: antes de la posición 1 (es decir, en el extremo amino terminal) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (es decir, en el extremo carboxilo terminal de la proteína de SEQ ID N.°: 1 o las posiciones correspondientes en SEQ ID N.°: 2 y 3) como se describió anteriormente.



Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hace reaccionar con un análogo de N-acetilglucosamina unido a aminooxi por β (GlcNAc). Se mezclan la variante del polipéptido de relaxina (10 mg/mL) y el sacárido aminooxi (21 mM) en tampón acetato acuoso 100 mM (pH 5,5) y se incuban

a 37°C durante 7 a 26 horas. Un segundo sacárido se acopla enzimáticamente al primero mediante la incubación del polipéptido de relaxina conjugado con sacárido (5 mg/mL) con UDP-galactosa (16 mM) y β-1,4-galacitosiltransferasa (0,4 unidades/mL) en 150 mM tampón HEPES (pH 7,4) durante 48 horas a temperatura ambiente (Schanbacher y col. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061).

Ejemplo 21

Este ejemplo detalla la generación de un antagonista del polipéptido de relaxina PEGilado.

Se sustituye un residuo, incluso, entre otros, los que participan en la unión al receptor de relaxina por el siguiente aminoácido codificado no natural como se describió anteriormente. Una vez modificada, la variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene carbonilo se hará reaccionar con un PEG que contiene aminooxilo derivado de la forma:

R-PEG(N)-O-(CH2)n-O-NH2

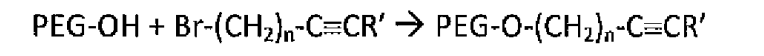
en donde R es metil, n es 4 y N es 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; o 40.000 MW para generar un antagonista del polipéptido de relaxina que comprende un aminoácido codificado no natural que está modificado con un derivado de PEG en un único sitio dentro del polipéptido. El acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como se describió anteriormente.

Ejemplo 22

Generación de un homodímero, heterodímero, homomultímero o heteromultímero de un polipéptido de relaxina en el cual las moléculas de relaxina están unidas directamente.

Se puede acoplar directamente una variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene alquino a otra variante del polipéptido de relaxina que comprende el aminoácido que contiene azido. De forma análoga, se puede acoplar un polipéptido de un polipéptido de relaxina a otro u otros polipéptidos para formar heterodímeros, homomultímeros o heteromultímeros. En los ejemplos 16 y 17 también se proporcionó una descripción de los multímeros que es posible formar y el acoplamiento, la purificación y los análisis se realizan como se describió anteriormente.

Ejemplo 23

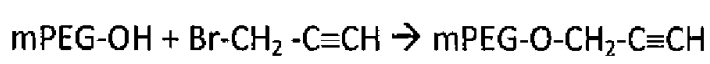


A B

Se hace reaccionar el polialquilenglicol (P-OH) con el haluro de alquilo (A) para formar el éter (B). En estos compuestos, n es un entero de uno a nueve y R' puede ser un grupo alquilo o heteroalquilo de C1 a C20, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada. R5 también puede ser un alquilo cíclico o heteroalquilo cíclico de C3 a C7,

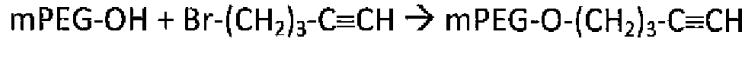
saturado o insaturado, un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido o un grupo alcarilo (el alquilo es un alquilo de C1 a C20 saturado o insaturado) o heteroalcarilo sustituido o no sustituido. Típicamente, PEG-OH es polietilenglicol (PEG) o monometoxi-polietilenglicol (mPEG) que tiene un peso molecular de 800 a 40.000 daltones (Da).

Ejemplo 24



Se trató mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL). Se añadieron una solución de bromuro de propargilo, disuelta como una solución al 80% en peso en xileno (0,56 mL, 5 mmol, 50 equiv., Aldrich) y una cantidad catalítica de KI a la solución y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 2 horas. Se añadió agua (1 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al residuo CH2C12 (25 mL) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 mL. Se añadió esta solución de CH2C12 a éter dietílico (150 mL) por goteo. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de éter dietílico frío y se secó para obtener propargil-O-PEG.

Ejemplo 25



Se trató el mPEG-OH con un peso molecular de 20.000 Da (mPEG-OH 20 kDa; 2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL). Se añadieron a la mezcla cincuenta equivalentes de 5-bromo-1-pentina (0,53 mL, 5 mmol, Aldrich) y una cantidad catalítica de KI. Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 16 horas. Se añadió agua (1 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al residuo CH2C12 (25 mL) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 mL. Se añadió esta solución de CH2C12 a éter dietílico (150 mL) por goteo. Se recogió el precipitado resultante, se lavó con varias partes de éter dietílico frío y se secó para obtener el alquino correspondiente. Se puede utilizar 5-cloro-1-pentina en una reacción similar.

Ejemplo 26

(1) *m*-$HOCH_2C_6H_4OH + NaOH + Br\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow$ *m*-$HOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$

(2) *m*-$HOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH + MsCl + N(Et)_3 \rightarrow$ *m*-$MsOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$

(3) *m*-$MsOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH + LiBr \rightarrow$ *m*-$Br\text{-}CH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$

(4) $mPEG\text{-}OH +$ *m*-$Br\text{-}CH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$

A una solución de 3-hidroxibencil alcohol (2,4 g, 20 mmol) en THF (50 mL) y agua (2,5 mL) se le añadió en primer lugar hidróxido de sodio en polvo (1,5 g, 37,5 mmol) y después una solución de bromuro de propargilo, disuelta como una solución al 80% en peso en xileno (3,36 mL, 30 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 6 horas. A la

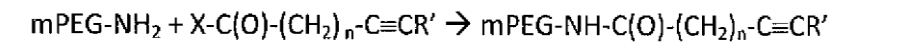
mezcla se le añadió ácido cítrico al 10 % (2,5 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3x15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre MgSO4 y se concentraron para dar el 3-propargiloxibencil alcohol.

Se añadieron cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una solución del compuesto 3 (2,0 g, 11,0 mmol) en CH2C12 a 0°°C y se colocó la reacción en el refrigerador durante 16 horas. El tratamiento final habitual proporcionó el mesilato como un aceti amarillo pálido. Se disolvió este aceite (2,4 g, 9,2 mmol) en THF (20 mL) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3x15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre Na2SO4 anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

Se disolvió mPEG-OH 20 kDa (1,0 g, 0,05 mmol, Sunbio) en THF (20 mL) y se enfrió la solución en un baño de hielo. Se añadió NaH (6 mg, 0,25 mmol) con agitación fuerte durante un período de varios minutos, seguido del añadido del bromuro obtenido anteriormente (2,55 g, 11,4 mmol) y una cantidad

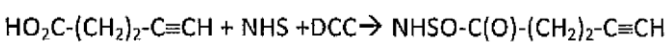
catalítica de KI. Se retiró el baño para enfriar y se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 mL) a la mezcla y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al residuo CH2C12 (25 mL) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 mL. El añadido por goteo a una solución de éter (150 mL) produjo un precipitado blanco, que se recogió para dar el derivado de PEG.

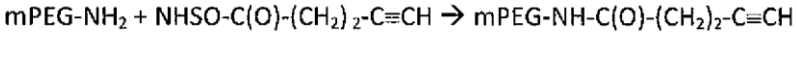
Ejemplo 27



Los polímeros de poli(etilenglicol) que contienen alquino terminal también se pueden obtener acoplando un polímero de poli(etilenglicol) que contiene un grupo funcional terminal con una molécula reactiva que contiene la funcionalidad alquino como se mostró anteriormente, n es entre 1 y 10. R' puede ser H o un grupo alquilo pequeño de C1 a C4.

Ejemplo 28

(1) 

(2) 

Se disolvió ácido 4-pentinoico (2,943 g, 3,0 mmol) en CH2C12 (25 mL). Se añadieron N-hidroxisuccinimida (3,80 g, 3,3 mmol) y DCC (4,66 g, 3,0 mmol) y se agitó la solución durante la noche a temperatura ambiente. Se utilizó el éster

de NHS 7 bruto resultante en la siguiente reacción sin más purificación.

Se disolvió mPEG-NH2 con un peso molecular de 5.000 Da (mPEG-NH2, 1 g, Sunbio) en THF (50 mL) y se enfrió la mezcla a 4°C. Se añadió éster de NHS 7 (400 mg, 0,4 mmol) en partes con agitación fuerte. Se dejó agitar la mezcla durante 3 horas mientras se llevó a temperatura ambiente. Se añadió agua (2 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al residuo CH2C12 (50 mL) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 mL. Se añadió esta solución de CH2C12 a éter (150 mL) por goteo. Se recogió el precipitado resultante y se secó al vacío.

Ejemplo 29

Este ejemplo representa la preparación del metansulfonil éster de poli(etilenglicol), que también se puede denominar metansulfonato o mesilato de poli(etilenglicol). Se pueden preparar el tosilato y los haluros correspondientes a través de procedimientos similares.

$$mPEG\text{-}OH + CH_3SO_2Cl + N(Et)_3 \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}SO_2CH_3 \rightarrow mPEG\text{-}N_3$$

Se destiló azeotrópicamente el mPEG-OH (MW = 3.400, 25 g, 10 mmol) en 150 mL de tolueno durante 2 horas bajo nitrógeno y la solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 40 mL de CH2C12 seco y 2,1 mL de

trietilamina seca (15 mmol). Se enfrió la solución en un baño de hielo y se añadieron 1,2 mL de cloruro de metansulfonilo destilado (15 mmol) por goteo. Se agitó la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche y se interrumpió la reacción mediante el añadido de 2 mL de etanol absoluto. Se evaporó la mezcla al vacío para extraer los disolventes, principalmente los que no eran tolueno, se filtró, se concentró nuevamente al vacío y se precipitó en 100 mL de éter dietílico. Se lavó el filtrado con varias partes de éter dietílico frío y se secó al vacío para obtener el mesilato.

Se disolvió el mesilato (20 g, 8 mmol) en 75 ml de THF y se enfrió la solución a 4°C. A la solución fría se le añadió azida sódica (1,56 g, 24 mmol). Se calentó la reacción a reflujo bajo nitrógeno durante 2 horas. Se evaporaron los disolventes y se diluyó el residuo con CH2C12 (50 mL). Se lavó la fracción orgánica con solución de NaCl y se secó sobre MgSO4 anhidro. Se redujo el volumen a 20 ml y se precipitó el producto mediante el añadido a 150 ml de éter frío seco.

Ejemplo 30

(1) N_3-C_6H_4-CO_2H → N_3-$C_6H_4CH_2OH$

(2) N_3-$C_6H_4CH_2OH$ → Br-CH_2-C_6H_4-N_3

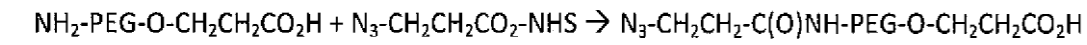
(3) mPEG-OH + Br-CH_2-C_6H_4-N_3 → mPEG-O-CH_2-C_6H_4-N_3

El 4-azidobencil alcohol se puede producir utilizando el método descrito en la patente estadounidense 5.998.595, que se incorpora al presente por referencia. Se añadieron cloruro de metansulfonilo (2,5 g, 15,7 mmol) y trietilamina (2,8 mL, 20 mmol) a una solución de 4-azidobencil alcohol (1,75 g, 11,0 mmol) en CH2C12 a 0°C y se colocó la reacción en el refrigerador durante 16 horas. El tratamiento final habitual proporcionó el mesilato como un aceti amarillo pálido. Se disolvió este aceite (9,2 mmol) en THF (20 mL) y se añadió LiBr (2,0 g, 23,0 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora y después se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió agua (2,5 mL) y se extrajo el disolvente al vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3x15 mL) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución saturada de NaCl (10 mL), se secaron sobre Na2SO4 anhidro y se concentraron para dar el bromuro deseado.

Se trató el mPEG-OH 20 kDa (2,0 g, 0,1 mmol, Sunbio) con NaH (12 mg, 0,5 mmol) en THF (35 mL) y se añadió el bromuro (3,32 g, 15 mmol) a la mezcla junto con una cantidad catalítica de KI. Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante 12 horas. Se añadió agua (1,0 mL) a la mezcla y se extrajo el disolvente al vacío. Se añadió al residuo CH2C12 (25 mL) y se separó la fase orgánica, se secó sobre Na2SO4 anhidro y se redujo el volumen a aproximadamente 2 mL. El

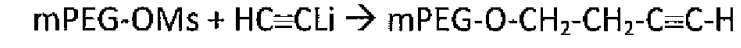
añadido por goteo a una solución de éter (150 mL) produjo un precipitado, que se recogió para dar mPEG-O-CH2-C6H4-N3.

Ejemplo 31



Se disolvió NH2-PEG-O-CH2CH2CO2H (MW 3.400 Da, 2,0 g) en una solución acuosa saturada de NaHCO3 (10 mL) y se enfrió la solución a 0°C. Se añadió propionato de 3-azido-1-N-hidroxisuccinimida (5 equiv.) con agitación fuerte. Después de 3 horas, se añadieron 20 mL de H2O y se agitó la mezcla durante otros 45 minutos a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con 0,5 N H2SO4 y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente 15 % (m/m). Se extrajo la mezcla de reacción con CH2C12 (100 mL x 3), se secó sobre Na2SO4 y se concentró. Después de la precipitación con éter dietílico frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó al vacío para dar el derivado de PEG omega-carboxiazida.

Ejemplo 32



A una solución de acetiluro de litio (4 equiv.), preparado como se conoce en la técnica y enfriado a -78 °C en THF, se le añade por goteo una solución de mPEG-OM disuelta en THF con agitación fuerte. Después de 3 horas, se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se interrumpió con el añadido de 1 ml de butanol. Se añadieron 20 mL de H2O y se agitó la mezcla durante otros 45 minutos a

temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 3 con 0,5 N H2SO4 y se añadió NaCl a una concentración de aproximadamente 15 % (m/m). Se extrajo la mezcla de reacción con CH2C12 (100 mL x 3), se secó sobre Na2SO4 y se concentró. Después de la precipitación con éter dietílico frío, se recogió el producto mediante filtración y se secó al vacío para dar el 1-(but-3-iniloxi)-metoxipolietilenglicol (mPEG).

Ejemplo 33

Se pueden incorporar aminoácidos que contienen azida y acetileno seleccionando los sitios en proteínas usando los métodos descritos en L. Wang y col., (2001), Science 292:498-500, J.W. Chin y col., Science 301:964-7 (2003)), J. W. Chin y col., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin y P. G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11): 1135-1137; J. W. Chin y col., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024: y L. Wang y P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm, 1:1-11. Una vez que se han incorporado los aminoácidos, se lleva a cabo la reacción de cicloadición con proteína 0,01 mM en tampón fosfato (PB), pH 8, en presencia de derivado de PEG 2 mM, 1 mM CuSO4 y ~1 mg de alambre de Cu durante 4 horas a 37 °C.

Ejemplo 34

Este ejemplo describe la síntesis de derivados de p-acetil-D,L-fenilalanina (pAF) y m-PEG-hidroxilamina.

La pAF racémica se sintetiza usando el procedimiento que se ha descrito previamente en Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. y Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746.

Para sintetizar el derivado de m-PEG-hidroxilamina, se realizan los siguientes procedimientos. A una solución de ácido (N-t-Boc-aminooxi)acético (0,382 g, 2,0 mmol) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (0,16 mL, 1,0 mmol) en diclorometano (DCM, 70 mL), que se agita a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora se le añaden metoxipolietilenglicol amina (m-PEG-NH2, 7,5 g, 0,25 mmol, Mt. 30 K, de BioVectra) y diisopropiletilamina (0,1 mL, 0,5 mmol). La reacción se agita a RT durante 48 horas y después se concentra a aproximadamente 100 mL. La mezcla se añade por goteo a éter frío (800 mL). El producto t-Boc-protegido se retira por precipitación y se recoge por filtración y se lava con éter 3x100 mL. Se purifica adicionalmente mediante una nueva disolución en DCM (100 mL) y la precipitación dos veces en éter (800 mL). El producto se seca al vacío con un rendimiento de 7,2 g (96%), confirmado por NMR y prueba de nihidrina.

El deBoc del producto protegido (7,0 g) obtenido anteriormente se realiza en TFA al 50%/DCM (40 mL) a 0 °C durante 1 hora y después a RT durante 1,5 hora. Después de extraer la mayor parte del TFA al vacío, la sal TFA del

derivado de hidroxilamina se convierte en la sal HCl añadiendo HCl 4 N en dioxano (1 mL) al residuo. El precipitado se disuelve en DCM (50 mL) y se precipita de nuevo en éter (800 mL). El producto final (6,8 g, 97%) se recoge por filtración, se lava con éter 3x100 ml, se seca al vacío y se almacena bajo nitrógeno. Otros derivados de PEG (5K, 20K) hidroxilamina se sintetizan utilizando el mismo procedimiento.

Ejemplo 35

Estudios in vivo de relaxina PEGilada

Se administran PEG-relaxina, relaxina no modificada y solución de tampón a ratones o ratas. Los resultados mostrarán actividad superior y vida media prolongada de la relaxina PEGilada de la presente invención en comparación con la relaxina no modificada. De forma similar, se administran relaxina modificada, relaxina no modificada y solución de tampón a ratones o ratas.

Análisis farmacocinético

Se administra un polipéptido de relaxina de la invención por vías intravenosa o subcutánea a ratones. Se toman muestras de sangre de los animales antes y en puntos de tiempo después de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo. Se puede calcular la vida media de eliminación y comparar entre polipéptidos de relaxina que comprenden un aminoácido codificado no natural y

relaxina natural o diversos polipéptidos de análogo de relaxina de la invención De forma similar, se pueden administrar los polipéptidos de relaxina de la invención a monos cynomolgus. Se toman muestras de sangre de los animales antes y en puntos de tiempo después de la dosificación. Se recoge plasma de cada muestra y se analiza por radioinmunoensayo.

Se puede administrar el polipéptido a los ratones mediante múltiples dosis, infusión continua o una dosis única, etc.

Ejemplo 36

Se expresa la relaxina utilizando el sistema de expresión de Novagen (promotor de T7 inducible; descrito detalladamente en el manual de sistemas de pET, versión 9, que se incorpora al presente por referencia), el vector de expresión pET30a y la cepa de expresión BL21(DE3).

Se inoculan 2 mL de cultivo de LB/kanamicina (10 µg/ml) con un barrido de la placa de BL21 (DE3) transformada con el análogo deseado. Esto disminuye los efectos causados por la variabilidad de colonia a colonia en los niveles de expresión. Se cultiva este cultivo durante la noche a 37°°C con agitación fuerte y al día siguiente, se inoculan 10 ml del cultivo de LB/Kanamicina con 1 ml del cultivo realizado durante la noche (OD600 ~ 0,4-0,5). Los mL restantes del

cultivo realizado durante la noche se pueden congelar como solución madre de glicerol.

Se colocan 10 mL del cultivo preparado a 37°C y 250 rpm durante 30-45 min hasta que la OD600 llegue a 0,8-0,9. Se somete a inducción con 1 mM IPTG (se puede apartar 1 mL como control de cultivo no inducido), se cosecha generalmente 3-4 horas después de la inducción y se analiza en SDS-PAGE.

También es posible realizar un tiempo-curso de la expresión (p. ej. los puntos 1, 2, 4, 6 horas después de la inducción y O/N) para determinar la tasa de acumulación, la estabilidad de la proteína, etc.

Análisis en gel: en un punto de tiempo deseado después de la inducción, se cosecha 1 mL del cultivo, se centrifugan las células, se resuspenden en 100 µl de 2X SDS-PAGE, se someten a ultrasonido para reducir la viscosidad y se corren 10 µl en SDS-PAGE. Si se desea, se puede comparar con el o los controles no inducidos o el control o estándar positivo conocido y se puede calcular el nivel de expresión (p. ej., una buena expresión podría ser > 100 µg/ml). También se puede utilizar análisis de transferencia Western. También es posible apartar 4 ml de los cultivos, preparar cuerpos de inclusión (si se expresan análogos insolubles) y obtener análisis de espectrometría de masas sobre estos para confirmar la identidad de la proteína sobreexpresada.

Para una expresión de la proteína a mayor escala, se inoculan > 250 mL de LB/Kanamicina (10 µg/ml) con 250 µL de solución madre de glicerol congelada y se cultiva durante la noche. Al día siguiente, se inoculan 10 X 1L de los cultivos de LB/Kanamicina con 25 ml del cultivo realizado durante la noche (OD600 ~ 0,1).

Los cultivos de 1L se cultivan a 37°C y 250 rpm ~ 2h hasta que la OD600 llegue a 0,8-0,9. Se induce con 1 mM IPTG y se cosecha 4 h después de la inducción o a la mañana siguiente (se puede utilizar centrifugación durante 15 min a 4.000 rpm para la cosecha). Se enjuagan los sedimentos con 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (50 ml por sedimento + 50 ml para enjuagar la botella) si se desea reducir la endotoxina y facilitar la purificación. Se mezclan los sedimentos y se centrifugan nuevamente.

Ejemplo 37

Estudio de expresión de Pichia *– Protocolos de preparación del ADN, electroporación, expresión*

Este ejemplo proporciona un protocolo para la preparación de polipéptidos de relaxina de la presente invención en *Pichia*. Se utilizan las SEQ ID N.°: 34, 35, 36 y 37, y se puede utilizar un plásmido para clonar en *Pichia*, se puede utilizar este u otros plásmidos modificados para obtener la expresión de la proteína de los polipéptidos de

relaxina en *Pichia*, se realizan las modificaciones al plásmido utilizando los métodos conocidos en la técnica.

El día 1 del protocolo, se realiza una digestión durante la noche, típicamente utilizando 2U de enzima por µg de ADN para digerir, se inoculan 10 mL de cultivo de YPhyD durante la noche en un matraz de 50 mL, con agitación a 260 rpm a 30°C de la solución madre de glicerol.

Preparación del ADN

Se precipita el ADN mediante el añadido en primer lugar de 1/10° volúmenes de 3M NaOAc estéril y después de 0,7 volúmenes de IPA estéril, la muestra se agita con fuerza y se continúa la precipitación durante la noche a -20°C o a -70°C hasta el congelamiento. Se sedimenta el ADN por centrifugación (centrífuga de mesa 14.000 rpm/10 minutos), se extrae el sobrenadante y se lava el sedimento con 500 µL de ETOH estéril al 70 %. Se centrifuga (centrífuga de mesa 14.000 rpm/10 minutos) y se decanta el sobrenadante y se seca al aire el sedimento durante 15-20 minutos. Se resuspende el sedimento de ADN con agua estéril a 1 µg/µl y se transforma Pichia con 10 µg de ADN.

Electroporación

Se utiliza el cultivo preparado durante la noche con OD_{600}, se diluye en YPhyD a OD_{600} = 0,2. Se agita el cultivo a 260 rpm a 30°°C hasta que la OD_{600} alcanza 0,8-1,0. Se recogen las células por centrifugación (4000 rpm/5 minutos). Se

decanta el medio, se lavan las células en 20 mL de agua estéril helada, se decanta nuevamente y se repite. Después del lavado con agua, se lava el sedimento en 20 mL de sorbitol 1 M estéril helado, se decanta y se resuspende, se lava el sedimento de células en 600 µL de sorbitol 1 M frío y después se puede almacenar sobre hielo.

De las células lavadas, se mezclan 50 µL con 10 µg de ADN linealizado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril, se mezcla suavemente y se incuba sobre hielo durante 25 minutos. Se transfiere la mezcla de células/ADN a una cubeta preenfriada de 0,2 cm utilizando puntas de pipeta largas. Las células se someten a electroporación utilizando una unidad BioRad GenePulsar II con la siguiente configuración: 2000 V, 200 Ohm, 25 µFd (usar monopulso), se añaden inmediatamente 0,5 mL de medio YPhyD a la cubeta y se mezclan por pipeteado. Se transfiere todo el contenido a un tubo de fondo redondo estéril y se agita suavemente (200 rpm) durante 30 minutos a 30°C. Las células se colocan en placas y se dispersan uniformemente, se incuban las placas invertidas durante 3 días a 30°C.

Después de la incubación durante tres días, se eligen las colonias con un bucle, se inoculan 10 ml de medio BYPhyD en un matraz de 50 ml y se incuban durante 3 días a 30°C. Se cuentan las colonias en las placas de 20µl, se registra la cantidad promedio y se cosechan las células, primero

preparando 2 conjuntos de crioviales etiquetados con el nombre de la cepa y el número de clones, relaxina (es decir, la proteína expresada) y la fecha. Se transfiere el cultivo a un tubo cónico de 15 ml, se mide la OD_{600} de cada cultivo, se diluye el cultivo 1:50 o 1:20 en medio YPhyD. Se guarda una alícuota del cultivo para la solución madre de glicerol. Se sedimenta la levadura a 4000 rpm durante 5 min a RT, se transfiere el sobrenadante a un tubo cónico de 15 mL nuevo etiquetado, y se guarda a —20 u 80°C hasta que sea necesario para los datos analíticos.

Análisis de expresión de la proteína

Se corren muestras en gel TB NuPAGE al 4-12% (Novex). Se utilizan reactivos de SDS-PAGE de Invitrogen, se analiza por análisis de transferencia Western o análisis de análisis de tinción de gel.

Formulaciones de los medios

Dextrosa levadura Phytone tamponada (BYPhyD)

Extracto de levadura 10 g/L

Peptona Phytone 20 g/L

Tampón fosfato de potasio 1 M (pH 6) 100 ml/L

10X YNB 100 mL/L

Dextrosa al 20% 100 mL/L

Dextrosa levadura Phytone (YPhyD)

Extracto de levadura 10 g/L

Peptona Phytone 20 g/L

Dextrosa al 20% 100 ml/L

10X YNB (Base de nitrógeno para levaduras al 13,4% con sulfato de amonio sin aminoácidos)

Base de nitrógeno para levaduras 134 g/L

Ejemplo 38

Producción de relaxina A21G

En este ejemplo, se fermentó un cultivo de 4,0 L para producir 13,4 g de pasta de células húmeda y se realizó una preparación de un cuerpo de inclusión con y sin Triton-X100. Se produjeron 2,07 g de cuerpos de inclusión húmedos de este modo, seguido por solubilización y replegamiento. Se resuspendieron los cuerpos de inclusión con 200 mL de H_2O por gramo de cuerpos de inclusión húmedos (IB) hasta una concentración final de 3 mM y se añadió cisteína a la resuspensión. Se solubilizan los IB por aumento de pH a 11,5 durante 1 hora a RT. Se dejó que se produjera el replegamiento bajando el pH del material solubilizado a 10,6±0,1 y se guardó a 2-8°°C durante ~72 horas y estos resultados se muestran en la figura 10. Se detuvo la reacción de replegamiento mediante el añadido de HCl hasta un pH final de 3,0, 0,45 µM se filtraron y se guardaron a 2-8°C hasta su procesamiento posterior.

Se purificó la proteína replegada mediante el aumento del pH de la interrupción del replegamiento a 8,0 con base Tris y se cargó directamente en una columna HP Q. La

conductividad de la carga en el caso que se muestra fue >3,5 mS/cm. Las condiciones de corrida fueron (A) Tris 20 mM, 8,0; (B) Tris 20 mM, 8,0; NaCl 200 mM y había 0-100%B sobre 30CV. Se agrupó la proinsulina replegada correctamente y se recuperaron 79 mg de proinsulina.

Se realizó la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) y la precipitación con 25 mM zinc, se resuspendió la proteína precipitada hasta una concentración de 2 mg/mL con 20 mM NaOAc, 4,0, ACN al 30%, 5 mM EDTA y se añadió 20K PEG hasta una proporción molar final de 10:1 de PEG a proteína y se dejó en incubación durante 48-72 horas a 28°C.

Se diluyó la reacción de PEG 1:10 en 0,5X PEG tampón A, se filtraron 0,22 µM y se corrieron sobre una columna SP 650S. Las condiciones de corrida fueron (A) 10 mM NaOAc, 4,0, 1 mM EDTA; (B) 10 mM NaOAc, 4,0, 1 mM EDTA, 0,4 M NaCl; 0-50%B sobre 20CV y se formularon las muestras de PEG en 10 mM citrato de sodio, 6,5; 150 mM NaCl y esto se muestra en la figura 12.

Estos métodos se utilizaron para producir diversos polipéptidos de relaxina con aminoácidos no naturales y un intervalo de 0,1-22 mg para las cantidades de proteína finales de las variantes purificadas y PEGiladas. Se descubrió que el ACN ayuda a solubilizar la mezcla PEG/proteína en la reacción de PEG y la precipitación de zinc en pI facilitó la concentración en presencia de CAN.

Ejemplo 39

Ensayo clínico humano de la seguridad o la eficacia de la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural.

Objetivo: Observar la seguridad y la farmacocinética de la relaxina humana recombinante PEGilada administrada por vía subcutánea que comprende un aminoácido codificado no natural.

Pacientes: se inscriben en el estudio dieciocho voluntarios sanos que varían entre 20 y 40 años de edad y pesan entre 60 y 90 kg. Los sujetos no tendrán valores de laboratorio anómalos clínicamente significativos para la hematología o química sérica y tendrán un examen toxicológico de orina, examen de VIH y antígeno de superficie de hepatitis B negativo. No deberían tener ningún indicio de lo siguiente: hipertensión; antecedentes de cualquier enfermedad hematológica primaria; antecedentes de enfermedad hepática, renal, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinaria, metabólica, neurológica significativa; antecedentes de anemia o trastorno de apoplejías; sensibilidad conocida a productos derivados de bacterias o mamíferos, PEG o albúmina sérica humana; consumidor habitual y en gran cantidad de bebidas que contengan cafeína; participación en cualquier otro ensayo clínico o que hayan recibido una transfusión de sangre o que la hayan donado en un período de 30 días del ingreso al estudio; que hayan tenido exposición a relaxina en un período

de tres meses del ingreso al estudio; que hayan tenido una enfermedad en un período de siete días del ingreso al estudio; y que tengan anomalías significativas en el examen físico previo al estudio o en las evaluaciones de laboratorio clínico en un período de 14 días del ingreso al estudio. Todos los sujetos son evaluables con respecto a la seguridad y se realizan todas las tomas de muestras de sangre para el análisis farmacocinético según lo programado. Todos los estudios se realizan con aprobación del comité de ética institucional y con el consentimiento del paciente.

Diseño del estudio: Este será un estudio cruzado de dos períodos, aleatorio, abierto, en centro único, de fase I en voluntarios varones sanos. Se asignan aleatoriamente dieciocho sujetos a uno de dos grupos de secuencia de tratamiento (nueve sujetos/grupo). Se administra relaxina durante dos períodos de dosificación separados como una inyección s.c. de bolo en la parte superior del muslo usando dosis equivalentes de relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural y el producto disponible en el mercado seleccionado. La dosis y frecuencia de administración del producto disponible en el mercado son como se indica en el prospecto. Se pueden añadir al estudio dosificación adicional, frecuencia de dosificación u otros parámetros según se desee, utilizando los productos disponibles en el mercado incluyendo grupos adicionales de

sujetos. Cada período de dosificación se separa por un período de 14 días sin tratamiento. Los sujetos deben permanecer en el centro de estudio al menos 12 horas antes y 72 horas después de la dosificación durante cada uno de los dos períodos de dosificación, pero no entre los períodos de dosificación. Se pueden añadir grupos adicionales de sujetos si también se van a evaluar la frecuencia, dosificación adicional u otro parámetro para la relaxina PEGilada. La formulación experimental de relaxina es la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural.

Toma de muestras de sangre: Se extrae sangre seriada por punción venosa directa antes y después de la administración de relaxina. se obtienen muestras de sangre venosa (5 mL) para la determinación de las concentraciones séricas de relaxina aproximadamente 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación (3 muestras de valores de referencia) y aproximadamente en los siguientes momentos después de la dosificación: 30 minutos y a las 1, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco. Se realizan ensayos de laboratorio clínico en ayunas (hematología, química de suero y análisis de orina) inmediatamente antes de la dosis inicial el día 1, en la

mañana del día 4, inmediatamente antes de la dosificación del día 16 y en la mañana del día 19.

Métodos bioanalíticos: Se utiliza un kit de ELISA para la determinación de las concentraciones séricas de relaxina.

Determinaciones de seguridad: se registran los signos vitales inmediatamente antes de cada dosificación (días 1 y 16) y 6, 24, 48 y 72 horas después de cada dosificación. Las determinaciones de seguridad se basan en la incidencia y en el tipo de eventos adversos, y en los cambios en los ensayos de laboratorio clínico con respecto a los valores de referencia. Además, se evalúan los cambios desde antes del estudio en las mediciones de los signos vitales, incluida la presión sanguínea, y los resultados del examen físico.

Análisis de datos: Los valores de concentración sérica posteriores a la dosis se corrigen con respecto a las concentraciones de relaxina de referencia antes de la dosis restando de cada uno de los valores posteriores a la dosis la concentración de relaxina de referencia promedio determinada promediando los niveles de relaxina de las tres muestras recogidas 30, 20 y 10 minutos antes de la dosificación. Las concentraciones séricas de relaxina antes de la dosis no se incluyen en el cálculo del valor promedio si están por debajo del nivel de cuantificación del ensayo. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración sérica corregidos con respecto a las

concentraciones de relaxina de referencia. Los parámetros farmacocinéticos se calculan a través de métodos independientes del modelo en un sistema informático Digital Equipment Corporation VAX 8600 utilizando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración sérica máxima (Cmax); tiempo hasta concentración sérica máxima (tmax); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el momento cero hasta el momento de la última toma de muestra de sangre (AUC0-72) calculada utilizando la regla trapezoidal lineal; y vida media de eliminación terminal (t1/2), calculada a partir de la constante de velocidad de eliminación. La constante de velocidad de eliminación se calcula por regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la gráfica de concentración-tiempo logarítmica-lineal. Se calculan el promedio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos para cada tratamiento. Se calcula la proporción de los promedios de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

Resultados de seguridad: La incidencia de los eventos adversos se distribuye uniformemente entre los grupos de tratamiento. No hay cambios clínicamente significativos con respecto a los valores de referencia o los ensayos de laboratorio clínico anteriores al estudio o las presiones

sanguíneas, y no hay cambios notables desde antes del estudio en los resultados del examen físico ni en las mediciones de signos vitales. Los perfiles de seguridad para los dos grupos de tratamiento deberían ser similares.

Resultados farmacocinéticos: perfiles de concentración sérica de relaxina promedio-tiempo (no corregidos para los niveles de relaxina de referencia) en los 18 sujetos después de recibir relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural en cada punto de tiempo medido. Todos los sujetos deben tener concentraciones de relaxina de referencia predosis dentro del intervalo fisiológico normal. Se determinan los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de suero corregidos con respecto a las concentraciones de relaxina de referencia promedio predosis y se determinan Cmax y tmax. El tmax promedio para cualquier comparador o comparadores clínicos seleccionados es significativamente más corto que el tmax para la relaxina PEGilada que comprende el aminoácido codificado no natural. Los valores de vida media terminal son significativamente más cortos para el comparador o los comparadores preclínicos evaluados en comparación con la vida media terminal para la relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural.

Aunque el presente estudio se realiza en sujetos varones sanos, se preverían características de absorción y perfiles de seguridad similares en otras poblaciones de

pacientes; tales como pacientes varones o mujeres con diabetes, pacientes varones o mujeres con cáncer o insuficiencia renal crónica, pacientes con insuficiencia renal pediátrica, pacientes en programas de predepósito autólogo o pacientes con cirugía electiva programada.

En conclusión, las dosis únicas administradas por vía subcutánea de relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural serán seguras y se tolerarán bien por sujetos varones sanos. Basándose en una incidencia comparativa de eventos adversos, valores de laboratorio clínico, signos vitales y resultados de exámenes físicos, los perfiles de seguridad de las formas disponibles en el mercado de relaxina y relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural serán equivalentes. La relaxina PEGilada que comprende un aminoácido codificado no natural potencialmente proporciona una gran utilidad clínica a los pacientes y a los proveedores de atención médica.

Ejemplo 40

Desarrollo del ensayo funcional de relaxina

Este ejemplo proporciona los detalles del ensayo funcional de relaxina. Se utilizaron monocitos de sangre periférica humana, células THP-1, para demostrar el aumento medible de cAMP junto con los controles positivos Isoproterenol y Forskolin. Se preincubaron las células THP-1 en 500uM IBMX durante 30 minutos, se sometieron a

coestimulación RLX con 2uM Forskolin durante 20 min. Isoproterenol, Forskolin y polipéptidos de relaxina, incluso natural A (con alanina en la 1° posición de aminoácido de la cadena B) y la variante RLX-BA1-AV13pAF (variante de relaxina con la secuencia de aminoácidos de la estructura de la alanina en la 1° posición de aminoácido de la cadena B con un pAF sustituido para la posición 13 (una valina) en la cadena A, con cuatro (4) PEG de tamaños diferentes unidos: 5K, 10K, 20K y 30K. TABLA 5

TABLA 5:

Ensayo funcional de valores de EC50 brutos [ng/mL]

Muestra	**11/4/2010**	**11/5/2010**	**11/5/2010**
RLX-D-WT	1,5	1,5	1,0
RLX-A-WT-001	3,6	3,3	2,6
RLX-A-AQ1-20KPEG-001		38	
RLX-A-AA5-20KPEG-001		41	
RLX-A-AV13-20KPEG-001		56	
RLX-A-AR18-20KPEG-001		68	
RLX-A-BV7-20KPEG-001	54		
RLX-A-BA18-20KPEG-001	172		
RLX-A-BW28-20KPEG-001	172		
RLX-A-BE5-20KPEG-001			45
RLX-D-BE5-20KPEG-001			58
RLX-D-AL2-20KPEG-001			43

Ejemplo 41

Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos de relaxina PEGilados 20 kDa después de una inyección subcutánea única en ratas SD.

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (SD) de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 7-8 semanas de

edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio.

Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 80 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados con PEG-relaxina para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados):

Día 1: predosis, 1, 2, 4, 8, 12, 25, 34, 50, 58, 73 y 80 horas después de la dosis.

Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva estándar generada a partir del compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente. El análisis compartimentalizado se realizó utilizando dos compartimientos, modelo de

eliminación de 1° orden y la ecuación de ajuste de modelo Gauss-Newton (Levenberg-Hartley). La tabla 6 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de PEG-relaxina en función del tiempo. La figura 8 compara la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para todos los compuestos de PEG-relaxina dosificados. Todos los grupos de dosis presentaron niveles de PEG-relaxina sérica medibles.

La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 9 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AQ1-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 10 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AA5-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 11 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AR18-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 12 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-BV7-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 13 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-BW28-RLX. La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 14 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de PEG20K-AV13.

Los datos del análisis no compartimentalizado de concentración sérica en función del tiempo de los animales dosificados por vía subcutánea se resume en la tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones séricas promedio para ratas SD después de una dosis única de PEG-relaxina.

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	1	30,8	19,4	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	2	87,4	25,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	4	184,8	50,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	8	237,6	61,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	12	371,2	106,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	25	394,0	50,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	34	278,7	59,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	50	63,4	11,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	58	45,6	6,8	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	73	20,3	5,6	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	80	11,6	1,3	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	1	19,9	6,4	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	2	100,1	51,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	4	185,0	104,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	8	264,7	128,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	12	434,3	135,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	25	438,0	55,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	34	353,5	44,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	50	86,9	19,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	58	62,4	10,6	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	73	32,8	8,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	SC	Macho	80	22,1	5,4	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	1	33,9	17,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	2	109,7	32,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	4	172,7	48,2	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	8	270,5	55,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	12	332,5	57,7	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	25	398,6	37,6	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	34	264,3	33,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	50	76,7	6,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	58	61,8	9,0	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	73	25,0	4,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	SC	Macho	80	14,9	37	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	1	25,7	4,6	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	2	98,9	20,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	4	248,5	75,5	5
4	20KPEG BV7	0,5	SC	Macho	8	343,5	81,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	12	457,3	91,0	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	25	518,5	57,7	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	34	270,4	64,5	5

4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	50	104,0	14,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	58	63,5	8,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	73	26,0	3,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	SC	Macho	80	22,6	2,6	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	1	36,4	15,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	2	107,9	61,5	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	4	228,5	86,0	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	8	380,9	144,0	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	12	486,6	135,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	25	511,0	60,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	34	404,8	51,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	50	184,2	31,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	58	122,3	37,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	73	48,8	6,1	5
5	20KPEG-BW28	0,5	SC	Macho	80	37,1	5,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	1	44,9	16,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	2	138,9	60,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	4	345,7	117,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	8	533,6	157,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	12	630,1	201,2	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	25	742,5	117,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	34	540,7	31,0	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	50	320,9	21,3	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	58	209,4	22,5	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	73	75,0	4,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	SC	Macho	80	58,7	7,7	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, predosis

Tabla 7

	AQ1-RLX	AA5-RLX	AR18-RLX	BV7-RLX	BW28-RLX	AV13-RLX
HL terminal (h)	10,7	12,2	12,5	13,1	13,9	14,6
C_{max} (ng/mL)	394,0	438,0	345,9	471,6	511,0	742,5
T_{max} (h)	25,0	25,0	25,0	12,0	25,0	25,0
AUC_{inf} (ng*h/mL)	14237,9	16095,9	12985,5	17260,9	22191,2	32230,5
Vz (mL/kg)	540,7	547,4	694,7	546,9	452,6	325,4
CL (mL/h)	35,1	31,1	38,4	28,9	22,5	15,5
MRT (h)	26,7	29,4	27,7	27,9	31,1	32,7

Se evaluaron las curvas de concentración en función del tiempo por análisis no compartimentalizado (Pharsight, versión 4.1). N=5 ratas por grupo, HL terminal, vida media terminal; Cmax, concentración sérica máxima medida; Tmax,

tiempo en el que se produjo la Cmax; AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración-tiempo para todas las muestras de suero/puntos de tiempo extrapolados al infinito; Cl, eliminación sérica total aparente; Vz, volumen de distribución aparente durante la fase terminal.

Las soluciones de dosis se midieron con los métodos ECLIA utilizados para las mediciones de concentración sérica. Las soluciones de dosificación se diluyeron de modo que se encontraran dentro del intervalo del ensayo. Todas las soluciones de dosis de 20KPEG-RLX se encontraron dentro del 30 por ciento de diferencia especificada con respecto al valor teórico (PDT). La tabla 8 a continuación resume los resultados de los análisis de solución de dosis para este estudio.

Tabla 8

Predosis en tampón (DSA1)	Conc. nominal (ng/mL)	Factor de dilución	Conc. (ng/mL)	%PDT
RLX A-AQ1-20K PEG	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K PEG	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K PEG	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K PEG	500000	20000	571645	14

Ejemplo 42

Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas del compuesto de relaxina natural (WT) después de una inyección subcutánea única en ratas SD.

Se obtuvieron ratas SD de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 5 semanas de edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio.

Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 12 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados con relaxina rh wt para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados): Día 1: predosis, 0,33, 0,66, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 horas después de la dosis.

Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva estándar generada a partir del compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente.

La tabla 9 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de relaxina rh wt en función del tiempo. La figura 1 compara la concentración sérica promedio del grupo en función del tiempo para la relaxina rh wt. Todos los animales presentaron niveles de relaxina sérica medibles.

La concentración sérica individual en función del tiempo se graficó en la figura 2 a partir de animales dosificados SC con 0,5 mg/kg de relaxina wt. Los datos del análisis no compartimentalizado de concentración sérica en función del tiempo de los animales dosificados por vía subcutánea se resume en la tabla 2. La tabla 9 resume los análisis de solución de dosis. Las soluciones de dosificación cumplían con los criterios aceptables de inferior o igual al 30 % PDT.

Tabla 9

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	PD	BQL	NE	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	0,33	244,0	18,7	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	0,66	227,9	45,6	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	1	211,7	45,9	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	1,5	166,7	38,7	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	2	119,9	24,5	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	3	52,5	23,0	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	4	24,1	11,4	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	5	7,7	2,6	5
1	Relaxina rh wt	0,5	SC	Macho	6	BQL	NE	5
1	Relaxina rh	0,5	sc	Macho	9	BQL	NE	5

	wt							
1	Relaxina rh wt	0,5	sc	Macho	12	BQL	NE	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, predosis

Tabla 10

Valores de parámetros farmacocinéticos para la relaxina rh wt dosificada en ratas SD.

	Relaxina rh wt
HL terminal (h)	0,8 (0,1)
C_{max} (ng/mL)	258,1(26,1)
T_{max} (h)	0,5 (0,2)
AUC_{inf} (ng*h/mL)	508,9 (81,8)
Vz (mL/kg)	1159 (284)
CL (mL/h)	1006 (185)
MRT (h)	1,56 (0,16)

Se evaluaron las curvas de concentración en función del tiempo por análisis no compartimentalizado (Pharsight, versión 4.1). N=5 ratas por grupo, HL terminal, vida media terminal; Cmax, concentración sérica máxima medida; Tmax, tiempo en el que se produjo la Cmax; AUC_{inf}, área bajo la curva de concentración-tiempo para todas las muestras de suero/puntos de tiempo extrapolados al infinito; Cl, eliminación sérica total aparente; Vz, volumen de distribución aparente durante la fase terminal. Los números son un promedio con la SD entre paréntesis.

Tabla 11

Las soluciones de dosis se midieron con los métodos ECLA utilizados para las mediciones de concentración sérica. Las

soluciones de dosificación se diluyeron de modo que se encontraran dentro del intervalo del ensayo. Todas las soluciones de dosis de relaxina rh wt se encontraron dentro del 30 por ciento de diferencia especificada con respecto al valor teórico (PDT). La tabla 3 a continuación resume los resultados de los análisis de solución de dosis para este estudio.

Tabla 11. Análisis de solución de dosis del artículo de prueba.

Análisis de solución de dosis	Conc. nominal (ng/mL)	Factor de dilución	Conc. (ng/mL)	%PDT
0,5 mg/mL predosis en tampón de formulación (DSA1)	250000	10000	208830	-16
0,5 mg/mL predosis en suero (DSA2)	250000	10000	225898	-10

Ejemplo 43

Este ejemplo evalúa las propiedades farmacocinéticas de un compuesto de relaxina PEGilado 20 kDa después de una inyección subcutánea o intravenosa única en ratas SD.

Se obtuvieron ratas SD de Charles River Laboratories (CRL) de aproximadamente 7-8 semanas de edad (aproximadamente 280 g en el inicio del estudio). Los animales se recibieron con la vena yugular cateterizada por CRL. Se aclimataron los animales durante 3 días antes de ingresar al estudio. Los animales recibieron una inyección subcutánea única el día 1 y se recogieron muestras PK en las 82 horas posteriores. Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados con PEG-

relaxina para el análisis de la concentración sérica de acuerdo con el siguiente programa de muestreo (los tiempos de muestreo son aproximados): Día 1: predosis, 1, 3, 5, 10, 25, 34, 48, 58, 72 y 82 horas después de la dosis.

Se midieron las concentraciones de compuesto utilizando un ECLA de enlace basado en un ensayo que fue desarrollado por Ambrx. Se calcularon las concentraciones utilizando una curva estándar generada a partir del compuesto dosificado correspondiente y se presentaron en un formato de hoja de cálculo de Excel (véase el apéndice). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 5.1). Se utilizó análisis no compartimentalizado para los datos de animales individuales con integración trapezoidal lineal hacia arriba/logarítmica hacia abajo, y los datos de concentración se ponderaron uniformemente. El análisis compartimentalizado se realizó utilizando dos compartimientos, modelo de eliminación de 1° orden y la ecuación de ajuste de modelo Gauss-Newton (Levenberg-Hartley).

La tabla 12 muestra valores promedio del grupo de concentración sérica de PEG-relaxina en función del tiempo.

Tabla 12

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Vía	Sexo	Tiempo (h)	Conc. promedio (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	PD	BQL	NE	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	1	2912,8	203,7	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	3	1310,8	115,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	5	700,7	68,3	4

1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	10	241,6	27,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	25	61,2	5,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	34	27,0	2,6	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	48	13,7	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	58	8,0	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	72	4,3	1,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Macho	82	2,2	0,6	4
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	1	16,3	4,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	3	75,8	20,2	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	5	96,3	26,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	10	135,1	30,1	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	25	257,4	48,5	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	34	184,9	26,8	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	sc	Macho	48	159,9	31,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	58	86,5	24,6	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	72	20,3	1,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	SC	Macho	82	11,8	1,1	5
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	PD	BQL	NE	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	1	12,8	1,3	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	3	45,3	6,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	5	62,2	8,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	sc	Macho	10	90,1	10,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	25	127,4	20,2	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	34	83,2	13,8	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	SC	Macho	48	32,6	2,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	sc	Macho	58	16,3	0,3	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	sc	Macho	72	4,9	0,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	sc	Macho	82	2,7	0,4	3
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	1	5,7	1,5	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	3	26,4	6,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	5	37,2	8,6	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	10	50,1	6,1	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	25	75,9	8,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	34	46,9	6,7	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	48	20,8	8,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	58	8,4	2,4	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	72	2,3	0,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	sc	Macho	82	1,3	0,4	5

NE, no evaluado; BQL, por debajo del límite cuantificable; PD, predosis

Ejemplo 44

Este ejemplo evalúa las dosis farmacológicamente activas y la exposición sistémica de la relaxina natural y una variante de PEG-relaxina en ratas Long-Evans hembra.

El objetivo de estos estudios de generación de señales fue establecer la actividad in vivo y definir una dosis farmacológicamente activa de la variante de PEG-relaxina. Para lograr estos objetivos, se evaluaron criterios de valoración fisiológicamente pertinentes que responden a la relaxina en ratas Long-Evans hembra incluido el consumo de agua, la producción de orina y valores seleccionados de química clínica sanguínea y en orina. Para permitir la identificación de los criterios de valoración candidatos, se evaluó la relaxina natural en primer lugar (fase 1) a las dosis calculadas para lograr concentraciones en plasma de 0,3X, 1X y 10X de una inhibición diana in vitro. Las dosis objetivo se administraron por dosificación intravenosa (IV) en bolo, seguido de infusión continua de 6 horas. Las dosis de 0,3X, 1X y 10X de relaxina natural indujeron aumentos del 95 %, el 68 % y el 32 %, respectivamente, en el consumo de agua en comparación con el vehículo. Los cambios en las concentraciones de sodio en plasma promedio con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron -9,5 y 1,2 mEq/L para el vehículo (0X); -5,8 y -9,0 mEq/L a 0,3X; 1,0 y -1.5 mEq/L a 1X; -4,7 y -1,4 mEq/L a 10X. Los cambios en la osmolaridad plasmática con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron -20,7 y 1,0 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -11,0 y -19,1 mosmol/kg de agua a 0,3X; 0,3 y

-4,4 mosmol/kg de agua para 1X; -10,3 y -3,8 mosmol/kg de agua para 10X.

Se administró PEG-relaxina (fase 2) en un volumen de bolo de 1 µL por gramo de peso corporal, se recolectó sangre 2 y 6 horas después de la dosificación y se recolectó orina durante el período de 6 horas después de la dosificación. El tratamiento con PEG-relaxina con dosis de 0,1X, 0,3X y 1X produjo aumentos del 93%, el 128% y el 105%, respectivamente, en el consumo de agua en comparación con el grupo de vehículo. Los cambios en las concentraciones de sodio en plasma promedio con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron 2,5 y 1,5 mEq/L para el vehículo (0X); -1,5 y -4,8 mEq/L a 0,1X; -4,0 y -2,9 mEq/L a 0,3X; -2,3 y -4,0 mEq/L a 1X. Los cambios en la osmolaridad plasmática con respecto al valor de referencia para 2 y 6 horas fueron 4,5 y 2,1 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -5,1 y -11,0 mosmol/kg de agua a 0,1X; -8,2 y -5,0 mosmol/kg de agua para 0,3X; -5,6 y -9,5 mosmol/kg de agua para 1X. No se produjeron cambios claros en los valores de química clínica en orina después del tratamiento con relaxina natural o PEG-relaxina. Estos datos establecen una actividad in vivo y permiten una selección de dosis fundamentada para los estudios posteriores de modelos de enfermedades in vivo con PEG-relaxina.

Tabla 13: Diseño del grupo de animales

Grupo	Artículo de prueba	Id. del animal	Concentración en plasma (aumento en veces con respecto a objetivo)	Concentración de dosis en bolo IV (mg/mL)	Concentración de infusión IV (mg/mL)[c]	N.° de animales por grupo
Dosificación[a] de relaxina natural de fase 1						
1	Relaxina natural	1F001-1F004	1X	0,003	0,08	4
2	Relaxina natural	2F001-2F004	10X	0,03	0,8	4
3[b]	Relaxina natural	3F001-3F004	Vehículo	Vehículo	Vehículo	4
4[b]	Relaxina natural	4F001-4F004	0,3X	0,001	0,026	4

[a]Los grupos 1 y 2 (1x y 10x) se evaluaron primero y como se observaron efectos relacionados con el artículo de prueba sobre el consumo de agua potable, los hematocritos y la producción de orina, se revisaron las dosis para el segundo conjunto de ratas con respecto al vehículo y 0,3X en los grupos 3 y 4, respectivamente. Hubo un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 1 y 2. También hubo un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 3 y 4.

[b]Las ratas en el grupo 1 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria y fueron asignadas al grupo 2 después del período sin tratamiento. Las ratas en el grupo 3 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria y fueron asignadas al grupo 4. Los números de los animales 001-004 siguieron siendo los mismos en los grupos 2 y 4 que eran en los grupos 1 y 3; sin embargo, las designaciones de número de grupo, grupo 2 y grupo 4, se utilizaron para permitir el

etiquetado de los tubos y la claridad de identificación de las muestras.

[c]Se inyectó relaxina natural por vía intravenosa en un volumen de bolo de 100 µL seguido de una tasa de infusión de 50 µL/hora.

Tabla 14:

Grupo	Artículo de prueba	Id. del animal	Concentración en plasma (aumento en veces con respecto a objetivo)	Concentración de dosis en bolo IV (mg/mL)[a]	N.° de animales por grupo
Dosificación de PEG-relaxina de fase 2					
5	PEG-relaxina	5F001-5F004	Vehículo	NA	4
6	PEG-relaxina	6F001-6F004	0,3X	0,03	4
7	PEG-relaxina	7F001-7F004	0,1X	0,01	4
8	PEG-relaxina	8F001-8F004	1,0X	0,1	4

[a]La dosis en bolo se administró en un volumen de 1 µL/g de peso corporal.

Relaxina natural de fase 1

Se obtuvieron ratas Long-Evans hembra de 12-14 semanas de edad con catéteres bilaterales en la vena yugular colocados quirúrgicamente por el proveedor de Charles River Laboratories. Se utilizaron dos conjuntos de cuatro ratas. Se utilizó cada conjunto para evaluar dos dosis de relaxina natural. Hubo un período sin tratamiento de 36 horas o más entre los grupos 1 y 2 y los grupos 3 y 4 ya que las ratas de los grupos 1 y 3 se volvieron a utilizar en los grupos 2 y 4, respectivamente. Las ratas tenían acceso a voluntad a alimento y a agua y se colocaron en el sistema de jaula

metabólica Culex ABS (Culex Automated Blood Sampler, Bioanalytical System Inc) la noche antes al inicio de la dosificación y durante las 6 horas posteriores a la dosis IV de bolo y el inicio de la dosificación por infusión.

Administración de la dosis de relaxina natural de fase 1

En la fase 1 cada rata recibió un bolo IV único y una infusión IV de 6 horas. La inyección IV de bolo se realizó a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente seguido de infusión IV a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente. Se dejó un período sin tratamiento de al menos 36 horas entre los grupos 1 y 2 en el primer conjunto de ratas y los grupos 3 y 4 en el segundo conjunto de ratas.

PEG-relaxina de fase 2

Se obtuvieron ratas Long-Evans hembra de 12-14 semanas de edad con catéteres bilaterales en la vena yugular colocados quirúrgicamente por el proveedor de Charles River Laboratories. Se utilizaron cuatro conjuntos de cuatro ratas, cada conjunto se utilizó para evaluar una dosis de PEG-relaxina. Las ratas que recibieron PEG-relaxina no se volvieron a utilizar después de un período sin tratamiento debido a la exposición plasmática ampliada de los compuestos PEGilados. Las ratas tenían acceso a voluntad a alimento y a agua y se colocaron en las jaulas metabólicas Culex ABS.

Administración de la dosis de PEG-relaxina de fase 2

En la fase 2, las ratas recibieron una inyección IV única a través de los catéteres yugulares implantados quirúrgicamente.

Todos los bolos y las soluciones de dosificación IV se formularon de acuerdo con estas instrucciones de descongelamiento y mezcla para todas las soluciones de dosis:

Se dejó descongelar el frasco de la muestra congelada para cada formulación de dosificación a 4°C durante 3 a 4 horas, con inspecciones por hora del proceso de descongelamiento. Cuando se completó el descongelamiento, se mezcló la formulación con una inversión suave con cuidado de no formar burbujas. Se tuvo precaución para mezclar bien y suavemente cada formulación justo antes de la dosificación intravenosa. Se mantuvo cada formulación de dosificación a 4°C hasta que se utilizó para la dosificación.

Las dosis se prepararon inmediatamente antes de la preparación y cada grupo recibió las siguientes concentraciones de dosis:

Fase 1 (grupos 1-4)	Grupo 1: (1X) bolo IV 0,003 mg/mL infusión IV 0,08 mg/mL
	Grupo 2: (10X) bolo IV 0,03 mg/mL infusión IV 0,8 mg/mL
	Grupo 3: (vehículo) bolo e infusión
	Grupo 4: (0,3X) bolo IV 0,001 mg/mL infusión IV 0,026 mg/mL
Fase 2 (grupos 5-8)	Grupo 5: bolo IV de vehículo NA
	Grupo 6: (0,3X) bolo IV 0,03 mg/mL
	Grupo 7: (0,1X) bolo IV 0,01 mg/mL
	Grupo 8: (1,0X) bolo IV 0,1 mg/mL

Los animales utilizados para este estudio se seleccionaron basándose en hallazgos aceptables de las mediciones de peso corporal, permeabilidad del catéter yugular y funcionalidad. Los animales identificados con catéteres no adecuados para la dosificación o la recolección de sangre antes del inicio del estudio o durante el período de recolección de sangre después del inicio de la dosificación fueron retirados del estudio y se reemplazaron por ratas con catéteres adecuados. El reemplazo de las ratas cateterizadas y la dosificación del compuesto se realizaron lo antes posible con respecto al plan de dosificación, la disponibilidad del personal y la recepción de ratas del proveedor.

Fase 1: Se asignaron aleatoriamente los animales de acuerdo con el peso corporal antes del estudio y se asignaron al grupo 1. Después de completar la dosificación, las ratas en el grupo 1 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria después del período sin tratamiento y fueron reasignadas al grupo 2. Después de completar la dosificación, las ratas en el grupo 3 fueron sometidas a una segunda asignación aleatoria después del período sin tratamiento y fueron reasignadas al grupo 4.

Fase 2: Se asignaron aleatoriamente los animales de acuerdo con el peso corporal antes del estudio y se asignaron a los grupos de 5 a 8.

Diariamente aproximadamente a los 30 minutos y 1, 2, 4, y 6 horas después del inicio de la dosificación. Se realizaron inspecciones visuales de los cambios físicos y del comportamiento, y los animales fueron analizados en cuanto a cambios en la postura corporal, pelaje, actividad, excremento, etc. Se obtuvieron mediciones rutinarias de los pesos corporales y se registraron antes de la dosificación.

Recolección, manipulación y análisis de muestras de sangre y orina

Protocolo del estudio de fase 1

La recolección de orina de referencia se inició la noche antes a las administraciones de las dosis, se continuó durante un período de 15-18 horas y se recolectaron en un frasco enfriado (hielo húmedo). Se recolectaron muestras de sangre de referencia (~400 µL de sangre entera) al final de la recolección de orina de referencia. El día del experimento, las ratas recibieron una inyección IV de bolo del artículo de prueba seguido de infusión continua con relaxina natural a una tasa de infusión constante administrada mediante una bomba de jeringa (Harvard 11 plus) durante 6 horas a través del catéter izquierdo de la vena yugular en volúmenes de 50 µL/hora. Se recolectaron dos muestras de sangre adicionales (~400 µL de sangre entera cada una) 2 y 6 horas después de la infusión de relaxina. Se recolectaron todas las muestras de sangre a través del

catéter yugular derecho y se colocaron en tubos de muestras que contenían anticoagulante K3EDTA utilizando el método de muestreo programado de Culex ABS, se almacenaron las muestras en un ambiente refrigerado hasta su procesamiento. Se recolectó orina en forma continua en un frasco enfriado a lo largo de la duración del período de infusión de relaxina. Se registró el volumen total de orina de cada recolección y se guardaron 2-5 mL de cada muestra de orina en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80°. Se registró el consumo de agua durante el período de infusión de 6 horas mediante la comparación del peso antes y después de la infusión del frasco + agua. Se detuvo la bomba de infusión después de 6 horas de infusión continua y se sometió a las ratas a un período sin tratamiento de al menos 36 horas antes de someterlas a la segunda evaluación de dosis.

Se necesitó infusión IV continua para mantener la concentración plasmática del fármaco buscada estable.

Protocolo del estudio de fase 2

La recolección de orina de referencia se inició la noche antes a las administraciones de las dosis durante un período de 15-18 horas y se recolectaron las muestras en un frasco enfriado. Se recolectaron muestras de sangre de referencia (~400 µL de sangre entera) al final del período de recolección de orina de referencia. El día del experimento,

las ratas recibieron una dosis única de PEG-relaxina por vía intravenosa en un volumen que no superó los 10 mL/kg/día (dosis única). Se recolectaron dos muestras de sangre adicionales (~400 µL de sangre entera) 2 y 6 horas después de la administración de relaxina. Se recolectaron todas las muestras de sangre a través del catéter yugular derecho y se colocaron en tubos de muestras que contenían anticoagulante K3EDTA utilizando el método de muestreo programado de Culex ABS, se almacenaron las muestras en un ambiente refrigerado hasta su procesamiento. Se recolectaron muestras de orina en forma continua desde el momento 0 hasta 6 horas después de la administración de PEG-relaxina en un frasco enfriado durante el muestreo. Se registró el volumen total de orina de cada recolección y se guardaron 2-5 mL de cada muestra de orina en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80 °C. Se realizó eutanasia a las ratas 6 horas después de la dosificación. Se registró el consumo de agua durante el período de infusión de 6 horas mediante la comparación del peso del frasco + agua al principio y al final del período de infusión del fármaco.

Patología

Se recolectaron muestras de orina como se describió anteriormente en este ejemplo. Se congelaron de dos a 5 mL de muestras de orina enfriadas sobre hielo seco y se guardaron en un sistema de congelador para mantenerlas a

aproximadamente -80 °C hasta su envío sobre hielo seco a AVL para el análisis de la creatinina en orina y BUN para determinar la eliminación de la creatinina.

Se recolectó una muestra de sangre utilizando el Culex ABS que utiliza K3EDTA como anticoagulante. Se colocaron quince microlitros de muestras de sangre entera en tubos capilares no tratados, se sellaron con arcilla en un extremo y se centrifugaron en una centrífuga de hematocritos (International Equipment Company, centrífuga IEC MB) durante cinco minutos. Se obtuvieron los resultados de hematocritos utilizando un dispositivo de lectura de microhematocritos proporcionado por el fabricante.

Se recolectó sangre para la determinación potencial de exposición sistémica de la relaxina natural y la PEG-relaxina de acuerdo con el plan de recolección y los procedimientos enumerados a continuación. Hubo tres intervalos de recolección. Los puntos de tiempo de recolección fueron 0, 2 y 6 horas después de la dosis para las ratas de la fase 1 y la fase 2. Fase 1: 8 animales por punto de tiempo. Fase 2: 16 animales por punto de tiempo. El volumen de recolección fue cercano a 400 microlitros de sangre entera. Se tomaron muestras de sangre de todos los animales en los grupos de 1 a 8 en tres puntos de tiempo: referencia (predosis t=0) y 2 y 6 horas después del inicio de la infusión para la dosificación IV de relaxina natural y después de la dosificación IV para

los grupos de dosificación de PEG-relaxina, respectivamente. Se registraron el momento del inicio de la dosificación por infusión IV y el momento real de cada toma de muestra de sangre en los datos brutos para cada animal. Por decisión del patrocinador, la sangre no se envió a Ambrx para las determinaciones de exposición sistémica durante la realización del estudio. Las muestras se almacenaron congeladas en un sistema de congelador Seventh Wave Labs para mantenerlas a aproximadamente -80°C y serán devueltas al patrocinador.

RESULTADOS de la relaxina natural de fase I

El consumo de agua promedio durante la infusión de 6 horas de las ratas tratadas con vehículo (0X) fue de 1,8 mL cada 100 gramos de peso corporal, y aumentó a 3,6, 3,1 y 2,4 mL cada 100 gramos de peso corporal en las ratas tratadas con 0,3X, 1X y 10X de relaxina natural, respectivamente. Son aumentos del 95 %, el 68 % y el 32 % sobre el vehículo para los grupos de dosificación de 0,3X, 1X y 10X respectivamente.

El promedio de hematocritos de referencia, 2 y 6 horas después del inicio de la dosificación fue del 35,1 %, el 35,0 % y el 34,3 % en las ratas tratadas con vehículo, respectivamente; del 33,1 %, el 33,7 % y el 32,3 % en el grupo de 0,3X; del 31,4 %, el 32,0 % y 33,7 % en el grupo de 1X; del 29,7 %, el 31,9 % y el 30,4 % en el grupo de 10X.

La producción de orina promedio durante la infusión de 6 horas fue de 1,8, 1,5, 1,2 y 1,2 mL cada 100 gramos de peso corporal para los grupos de vehículo (0X), 0,3X, 1X y 10X respectivamente.

La concentración de sodio en plasma promedio de referencia, 2 y 6 horas después del inicio de la dosificación fue de 139,3, 129,8, 140,5 mEq/L en el grupo de vehículo (0X); 141,8, 136,0 y 132,8 mEq/L en el grupo de 0,3X; 138,8, 139,8 y 137,3 mEq/L en el grupo de 1X; 137,0, 132,3 y 135,6 mEq/L en el grupo de 10X. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de -9,5 y 1,2 mEq/L para el vehículo (0X); -5,8 y -9,5 mEq/L a 0,3X; 1,0 y -1,5 mEq/L a 1X; -4,7 y -1,4 mEq/L a 10X.

Se calculó la osmolaridad plasmática utilizando la siguiente ecuación: Osmolaridad (OSM) = (2* na) + (Glu/18) + (BUN/2,8). La osmolaridad plasmática promedio de referencia, 2 y 6 horas después del inicio fue de 277,3 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,3X; 291,0, 291,3 y 286,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 1X; 286,4, 276,1 y 282,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 10X. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de -10,7 y 1,0 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); =11,0 e =19,1 mosmol/kg de agua a 0,3X; 0,3 y -4,4 mosmol/kg de agua para 1X; -10,3 y -3,8 mosmol/kg de agua para 10X. Los datos de química clínica en orina de

eliminación de BUN/Cr, Na se resumen en las tablas a continuación:

Tabla 3. Resumen de datos de química clínica en orina de relaxina natural (estudio de fase 1)

Grupos	BUN /Cr	sem	Eliminación de Na (mEq/h)	sem	Eliminación de BUN (mg/h)	sem	CrCl (mL/min /100g)	sem
Vehículo (referencia)	36	12	0,083	0,010	13,5	4,4	0,65	0,04
Vehículo (6 h estudio)	26	3	0,079	0,018	9,4	2,3	0,60	0,15
0,3X (referencia)	66	9	0,055	0,005	17,3	3,9	0,38	0,06
0,3X (6 h estudio)	43	6	0,071	0,015	12,1	1,3	0,45	0,07
1X (referencia)	18	2	0,046	0,010	7,6	1,5	0,62	0,09
1X (6 h estudio)	19	4	0,030	0,003	4,6	1,5	0,36	0,05
10X (referencia)	21	2	0,063	0,001	8,5	1,1	0,69	0,04
10X (6 h estudio)	17	4	0,055	0,005	4,9	0,7	0,81	0,11

Tabla 4. Datos brutos de química clínica en orina de relaxina natural (estudio de fase 1)

DOSIS	Grupo	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl(ml/min/100 g)
Vehicle	3F001 T0	68232	136	119	84	1080	0,702
Vehicle	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0,257
Vehicle	3F002 T0	68234	122	130	59	980	0,692
Vehicle	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0,979
Vehicle	3F003 T0	68236	276	130	54	2950	0,694
Vehicle	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0,552
Vehicle	3F004 T0	68238	355	126	52	3000	0,522
Vehicle	3F004 T6	68239	176	152	71	1320	0,614
0,3X	4F001 T0	68791	272	47	22	1950	0,413
0,3X	4F001 T6	68792	174	112	25	1500	0,356
0,3X	4F002 T0	68793	274	68	42	1860	0,522
0,3X	4F002 T6	68794	180	88	42	1500	0,657
0,3X	4F003 T0	68795	230	54	25	1800	0,329
0,3X	4F003 T6	68796	180	82	60	1880	0,449
0,3X	4F004 T0	68797	225	68	23	1440	0,260
0,3X	4F004 T6	68798	365	152	68	3100	0,352
1X	1F001-T0	67488	194	<40	64	1480	0,526
1X	1F001-T6	67489	138	62	57	960	0,394
1X	1F002-T0	67487	203	74	93	1540	0,579
1X	1F002-T6	67496	296	161	88	1300	0,337
1X	1F003-T0	67490	110	85	64	820	0,495
1X	1F003-T6	67495	176	167	104	1440	0,236
1X	1F004-T0	67483	224	74	67	1420	0,882

1X	1F004-T6	67492	94	<40	24	740	0,476

Tabla 4. Datos brutos de química clínica en orina de relaxina natural (estudio de fase 1) (continuación)

DOSIS	Grupo	ID	K	Na	Creat	BUN	CrCl(ml/min/100 g)
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0.670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0.729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0.598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0.618
10X	2F003-T0	67491	254	<40	103	1650	0.696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1.129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0.809
10X	2F004-T6	67493	212	125	85	1400	0.756

Unidades: Na (mEq/L); creatinina (mg/dL); BUN (mg/dL), glucosa (mg/dL), K (mmol/L). CrCl: mL/min/100 g BW

Eliminación de creatinina (CrCl)= (U creat. * U vol)/(P creat* U tiempo)

Tabla 5. Resumen de datos fisiológicos de relaxina natural (estudio de fase 1)

Dosis	Consumo de agua (0-6h) mL/100 g BW		Orina de referencia (-16-0h) mL/100 g BW		Orina (0-6h) mL/100 g BW	
	promedio	sem	promedio	sem	promedio	sem
Vehículo	1,8	0,4	4,1	0,4	1,8	0,3
0,3X	3,6	0,2	5,7	1,1	1,5	0,4
1X	3,1	0,6	3,8	0,6	1,2	0,6
10X	2,4	0,7	4,3	0,8	1,2	0,1

Dosis	Hematocritos (%)					
	0 h		2 h		6 h	
	promedio	sem	promedio	sem	promedio	sem
Vehículo	35,1	1,0	35,0	0,9	34,3	0,5
0,3X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4
1X	31,4	2,7	32,0	2,9	33,7	2,1
10X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4

RESULTADOS de la variante de PEG-relaxina de fase 2

El consumo de agua promedio durante el período de 6 horas después de la dosis de las ratas tratadas con vehículo

(0X) fue de 1,5 mL cada 100 gramos de peso corporal, y aumentó a 2,9, 3,4 y 3,1 mL cada 100 gramos de peso corporal en las ratas tratadas con 0,1X, 0,3X y 1X de variante de PEG-relaxina, respectivamente. Estos representan aumentos del 93 %, el 128 % y el 105 % sobre el promedio de los grupos de vehículo para los grupos de 0,1X, 0,3X y 1X, respectivamente.

La producción de orina promedio durante el período de 6 horas después de la dosis fue de 0,9, 0,2, 0,5 y 0,4 mL cada 100 gramos de peso corporal para el vehículo (grupos de 0X, 0,3X y 1X respectivamente). Las concentraciones de sodio en plasma promedio de referencia, 2 y 6 horas después de la dosificación fueron de 136,3, 138,8 y 137,8 mEq/L en el grupo de vehículo (0X), respectivamente; 138,5, 137,0 y 133,7 mEq/L en el grupo de 0,1X, respectivamente; 137,5, 133,5 y 134,6 mEq/L en el grupo de 0,3X, respectivamente; 137,3, 135,0 y 133,3 mEq/L en el grupo de 1X, respectivamente. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de 2,5 y 1,5 mEq/L para el vehículo (0X); -1,5 y -4,8 mEq/L a 0,1X; -4,0 y -2,9 mEq/L a 0,3X; -2,3 y -4,0 mEq/L a 1X.

La osmolaridad plasmática promedio de referencia, 2 y 6 horas después de la dosificación fue de 285,4, 289,9 y 287,5 mosmol/kg de agua en el grupo de vehículo (0X), respectivamente; 292,7, 287,6 y 281,7 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,1X, respectivamente; 287,6, 279,4 y 282,6 mosmol/kg de agua en el grupo de 0,3X, respectivamente;

289,3, 283,7 y 279,4 mosmol/kg de agua en el grupo de 1X, respectivamente. El cambio con respecto a la referencia a las 2 y 6 horas fue de 4,5 y 2,1 mosmol/kg de agua para el vehículo (0X); -5,1 y -11,0 mosmol/kg de agua a 0,1X; -8,2 y -5,0 mosmol/kg de agua para 0,3X; -5,6 y -9,9 mosmol/kg de agua para 1X.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos aquí se presentan únicamente con el fin de ilustrar la invención y que, en virtud de lo anterior, se sugiere a los entendidos en la técnica aplicar diversas modificaciones o cambios y estos deben incluirse dentro de la esfera y el espíritu de la presente solicitud, y del alcance de las reivindicaciones que se adjuntan. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes u otros documentos citados en la presente solicitud se incorporan en su totalidad por referencia a todos los efectos y en la misma medida en que se incorporarían si se indicara que cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento específico se incorpora específicamente al presente por referencia a todos los efectos.

REIVINDICACIONES (Divisional)

1. Un polipéptido de relaxina modificado que comprende un aminoácido codificado no naturalmente, en donde:

a) El polipéptido de relaxina que comprende el polipéptido de cadena de relaxina A de la SEQ ID NO: 4, y el polipéptido de cadena de relaxina B de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituido con un aminoácido codificado no naturalmente en una posición seleccionada del grupo que consiste de: residuo 1 de cadena A, residuo 2 de cadena A, residuo 5 de cadena A, residuo 13 de cadena A, residuo 18 de cadena A, residuo 5 de cadena B y residuo 7 de cadena B; y

b) dicho aminoácido codificado no naturalmente comprende un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste de: un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidracina, un grupo semicarbazida, un grupo azida, y un grupo alquino.

2. El polipéptido de relaxina modificado que comprende un aminoácido codificado no naturalmente, en donde:

a) el polipéptido de relaxina comprende el polipéptido de cadena de relaxina A de la SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de cadena de relaxina B de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 sustituido con un aminoácido codificado no naturalmente en una posición seleccionada del grupo

que consiste de: residuo 1 de cadena A, residuo 2 de cadena A, residuo 5 de cadena A, residuo 13 de cadena A, residuo 18 de cadena A, residuo 5 de cadena B, y residuo 7 de cadena B, en donde dicha cadena A y dicha cadena B contiene cada una hasta una sustitución de amino ácido adicional; y

b) dicho amino ácido codificado no naturalmente comprende una fenilalanina para-sustituida, orto-sustituida o meta-sustituida.

3. El polipéptido de relaxina modificado de la reivindicación 2, en donde dicha fenilalanina para-sustituida, orto-sustituida o meta-sustituida comprende un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste de: un grupo carbonilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazida, un grupo hidracina, un grupo semicarbazida, un grupo azida y un grupo alquino.

4. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido de cadena de relaxina A comprende el polipéptido de la SEQ ID NO: 4 sustituido con dicho aminoácido codificado no naturalmente en el residuo 1.

5. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicho aminoácido codificado no naturalmente esta unido a un ligador.

6. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho aminoácido

codificado no naturalmente comprende para-acetil-L-fenilalanina.

7. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho aminoácido codificado no naturalmente comprende para-azido-L-fenilalanina.

8. El polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho aminoácido codificado no naturalmente esta unido a un polímero.

9. Un método para hacer el polipéptido de relaxina modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende: expresar un polinucleotido que codifica dicho polipéptido de cadena de relaxina A y dicho polipéptido de cadena de relaxina B que comprende un codón selector que codifica dicho aminoácido codificado no naturalmente en la presencia de un tARN ortogonal que comprende dicho aminoácido codificado no naturalmente bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido de relaxina que comprende dicho aminoácido codificado no naturalmente.

10. Un polipéptido de relaxina que comprende uno o mas aminoácidos codificados no naturalmente.

11. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de relaxina de la reivindicación 10.

12. Un método para hacer el polipéptido de relaxina de la reivindicación 10, que comprende traducir un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de relaxina.

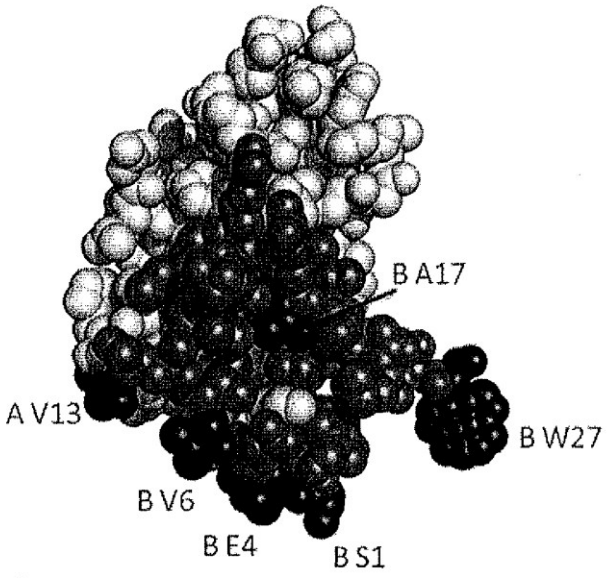
13. Una célula aislada que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 11.

Resumen

Se proporcionan polipéptidos de relaxina modificados y sus usos.

Figura 1

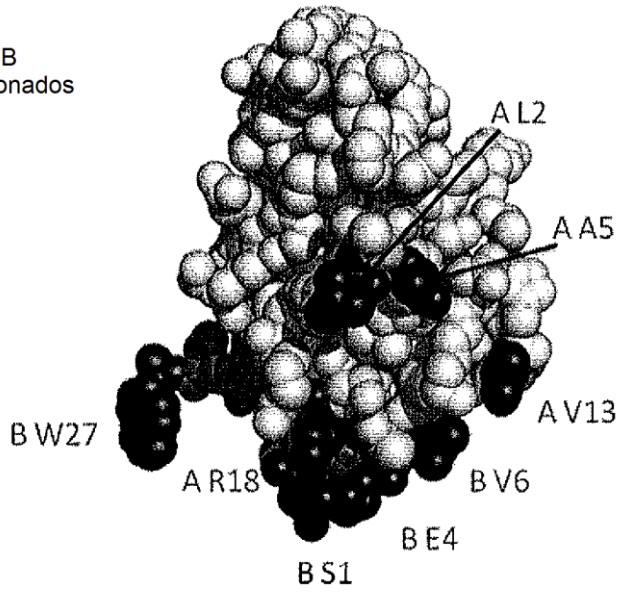
Gris claro = cadena A
Gris oscuro = cadena B
Negro = sitios seleccionados



6RLX
Numeración de insulina
Sitio fuera de la estructura: A Q-3

Figura 2

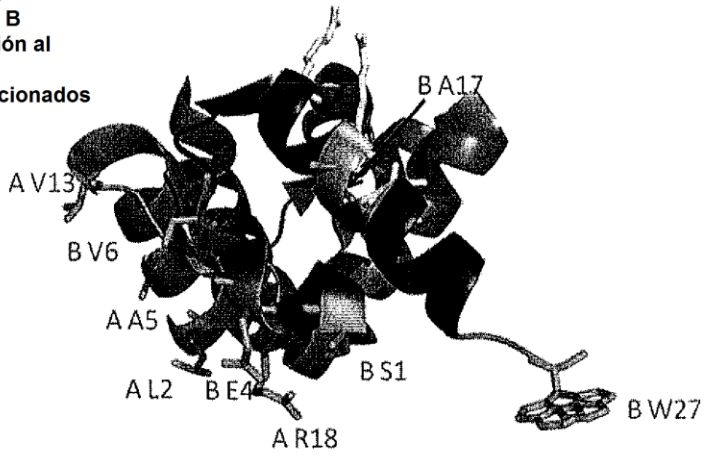
Gris claro = cadena A
Gris oscuro = cadena B
Negro = sitios seleccionados



6RLX
Numeración de insulina
Sitio fuera de la estructura: A Q-3

Figura 3

Azul claro = cadena A
Azul oscuro = cadena B
Amarillo = sitio de unión al receptor
Naranja = sitios seleccionados



6RLX
Numeración de insulina
Sitio fuera de la estructura: A Q-3

Figura 4

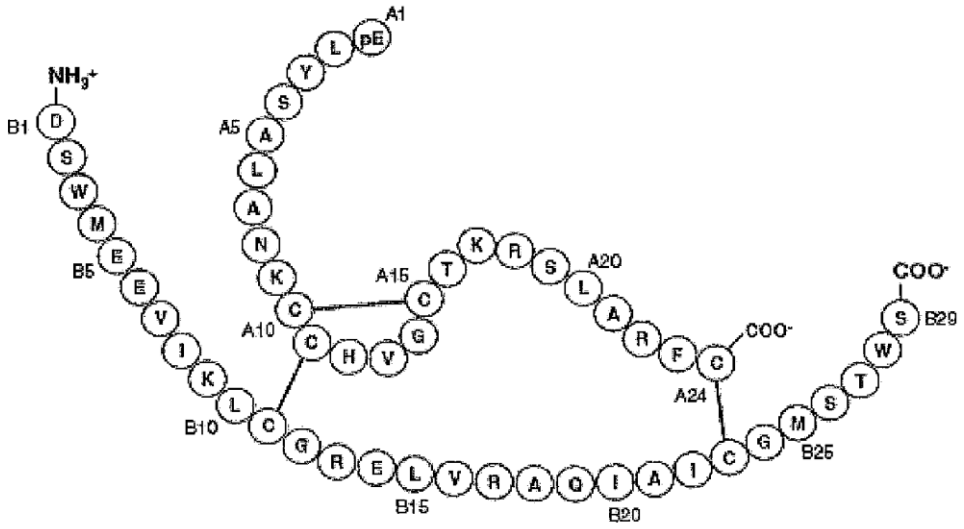
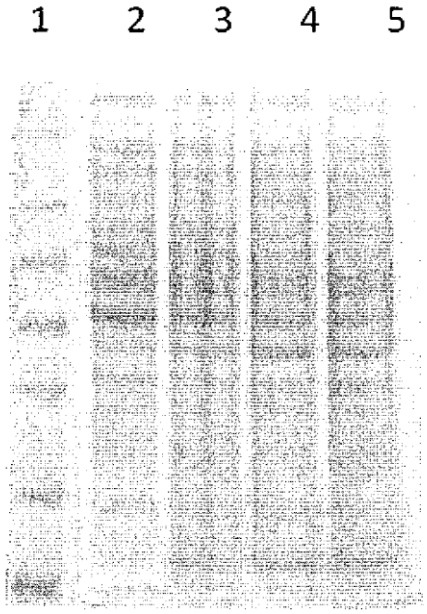

A1
pE
L
Y
S
A5
A
L
A
N
K
C
A10
C
H
V
G
A15
C
T
K
R
S
A20
L
A
R
F
C
COO-
A24
S
T
S
M
G
C
I
A
I
Q
A
R
V
L
E
R
G
B25
B20
B15
B10
L
K
I
V
E
E
B5
M
W
S
D
B1
NH3+
COO-
S
B29
W

Figura 5

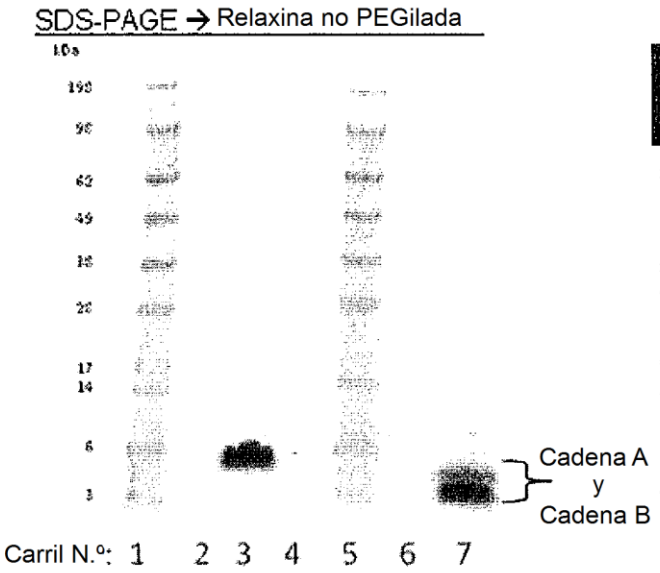


Carril	Muestra
1	Marcador SeeBlue2 MW
2	RLX-EX-002-129: 0h
3	RLX-EX-002-129: 2h
4	RLX-EX-002-129: 4h
5	RLX-EX-002-129: 6h

Prorrelaxina -BA1-AV13pAF

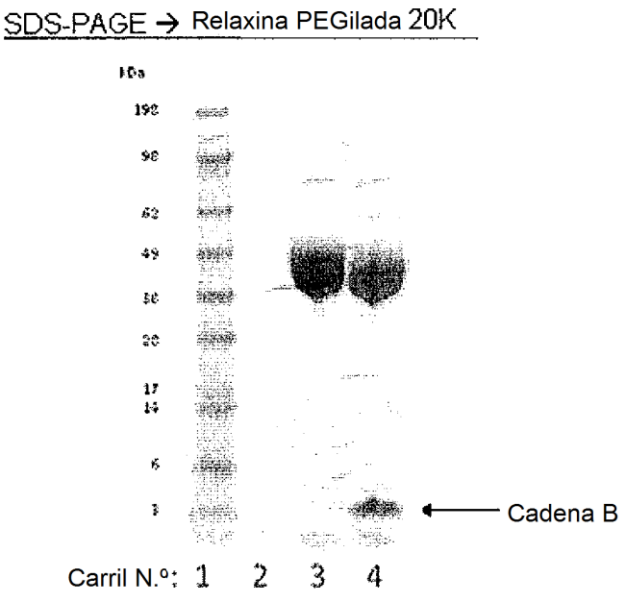
Figura 6

A.



Carril N.º	Asignación de carril
1	Marcador MW
2	---
3	Relaxina wt (NR)
4	---
5	Marcador MW
6	---
7	Relaxina wt (R)

B.



Carril N.º	Asignación de carril
1	Marcador MW
2	---
3	Relaxina PEG 20K (NR)
4	Relaxina PEG 20K (R)

Figura 7

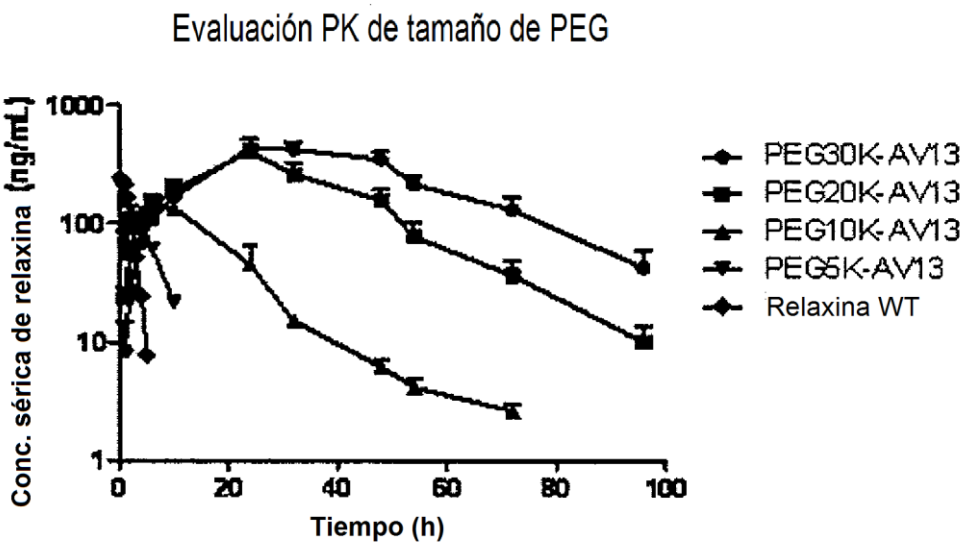

Evaluación PK de tamaño de PEG
Conc. sérica de relaxina (ng/mL)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (h)
PEG30K-AV13
PEG20K-AV13
PEG10K-AV13
PEG5K-AV13
Relaxina WT

Figura 8A

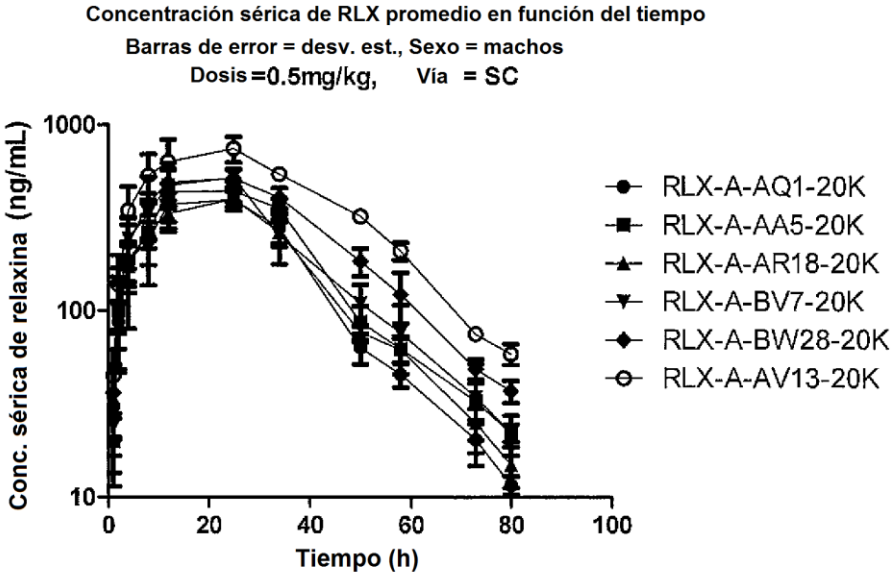


Figura 8B

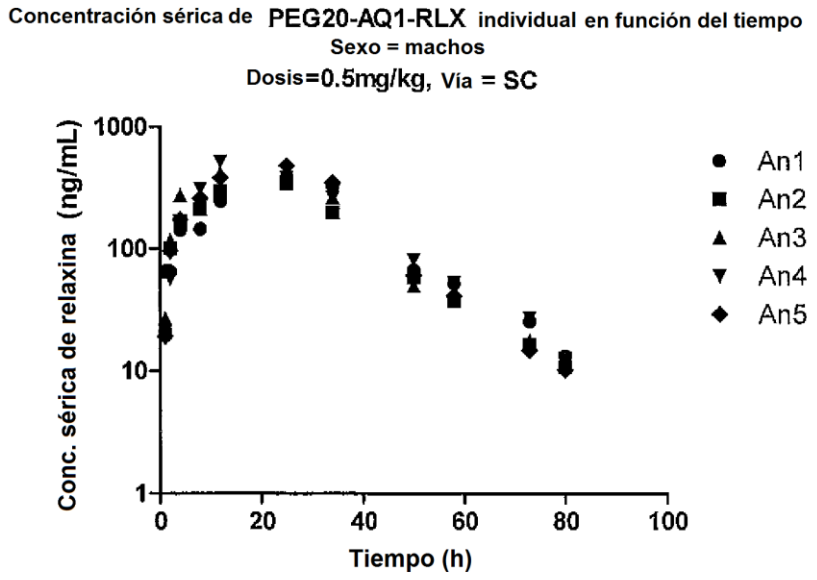


Figura 9A

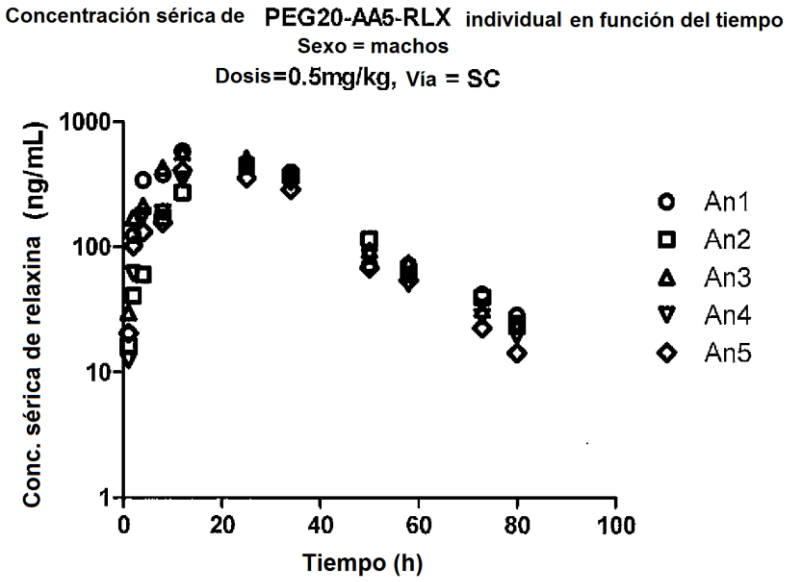


Figura 9B

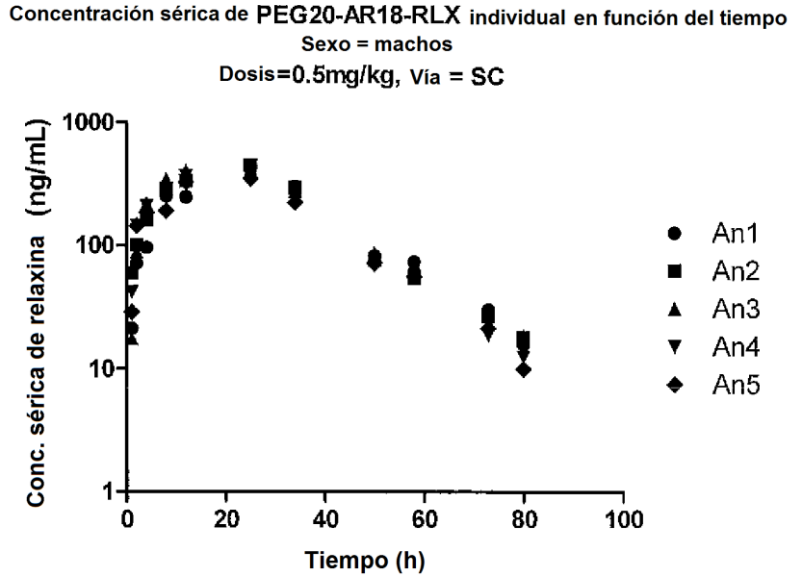


Figura 10A

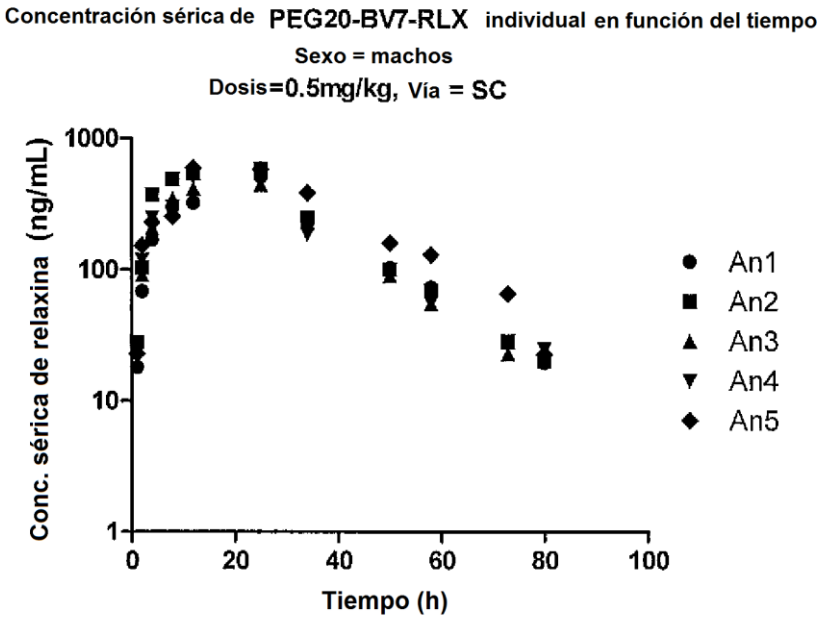


Figura 10B

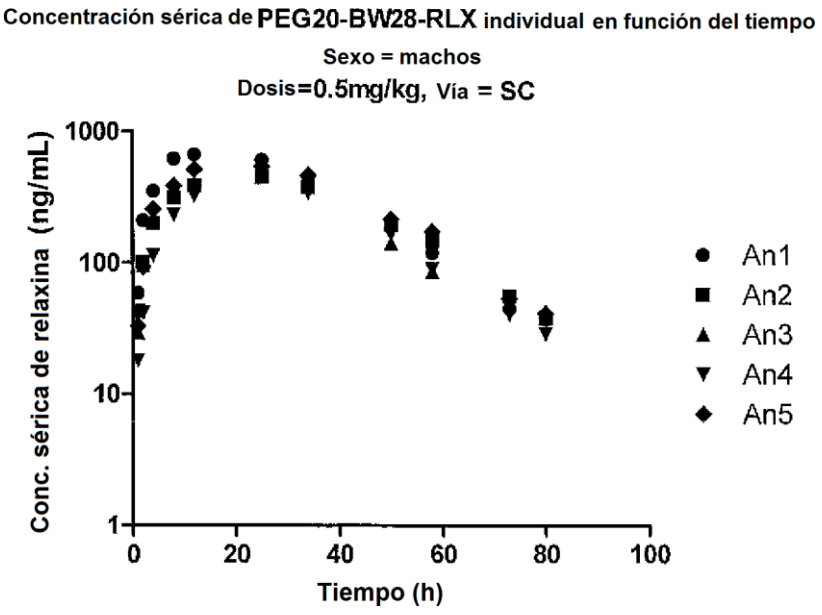
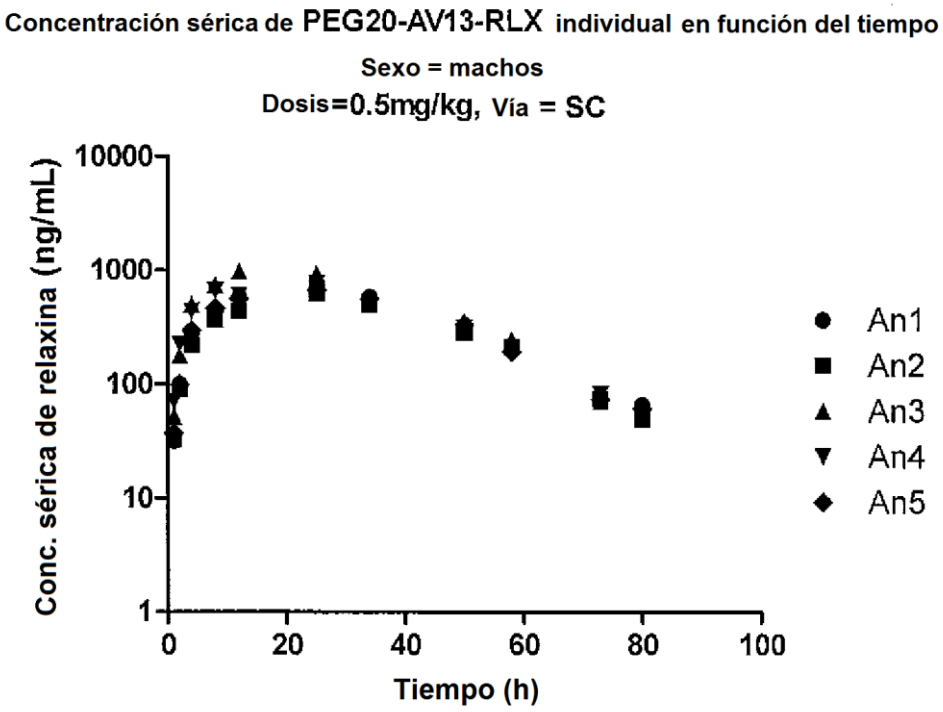


Figura 11


Concentración sérica de PEG20-AV13-RLX individual en función del tiempo
Sexo = machos
Dosis=0.5mg/kg, Vía = SC
Conc. sérica de relaxina (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (h)
An1
An2
An3
An4
An5

c

Figura 12A

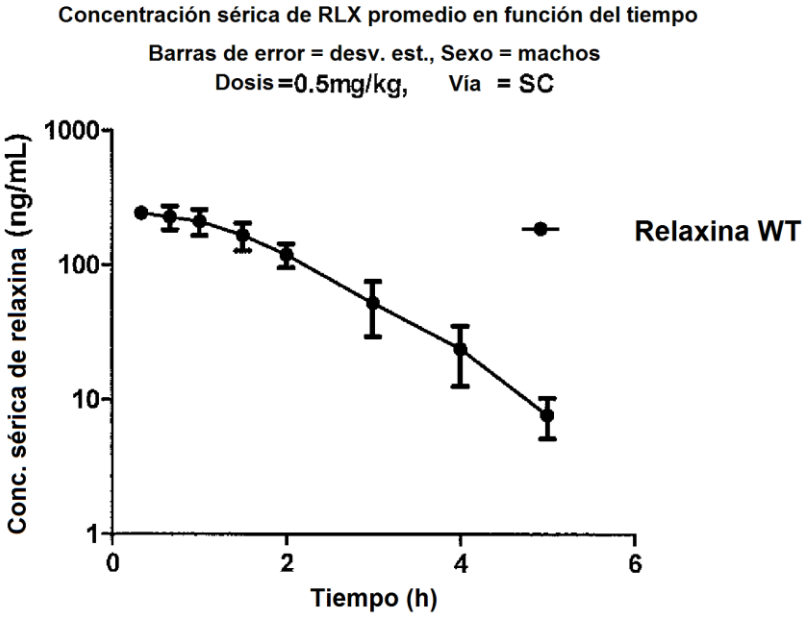


Figura 12B

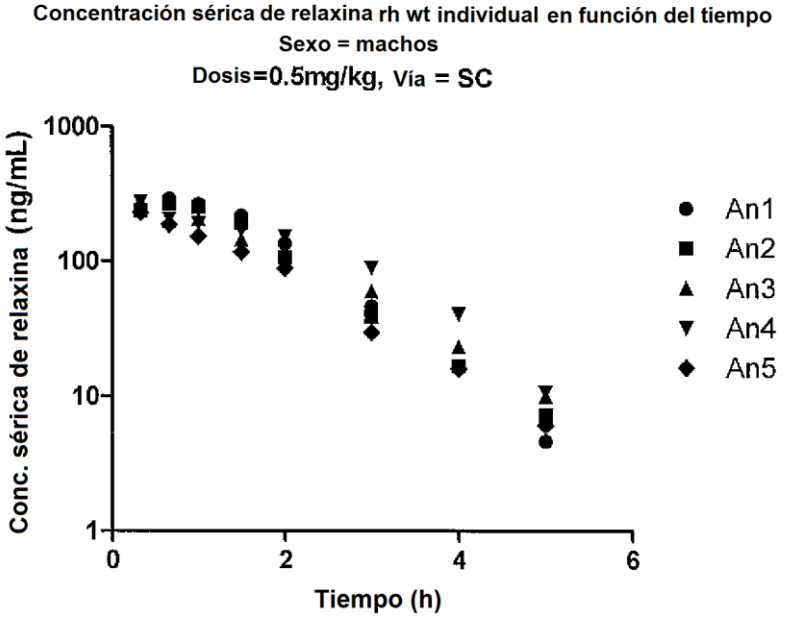


Figura 13A

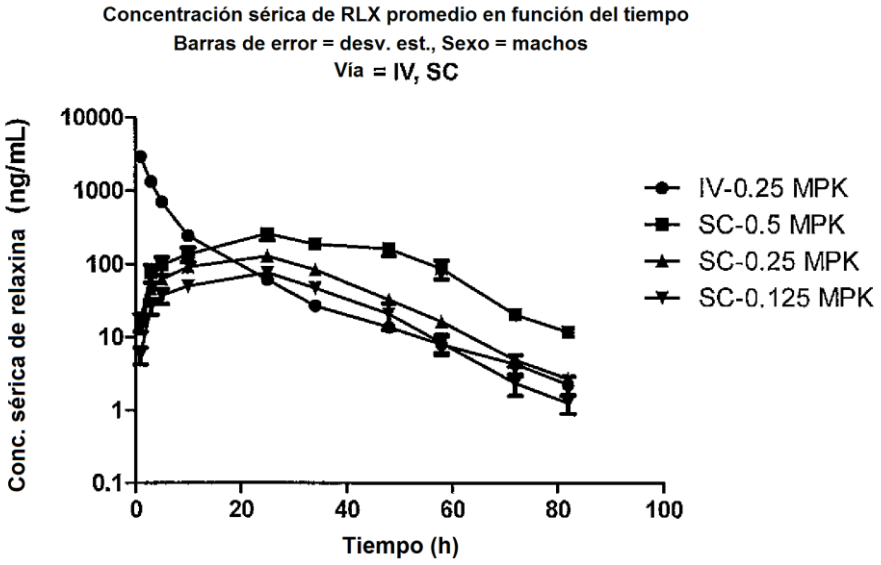


Figura 13B

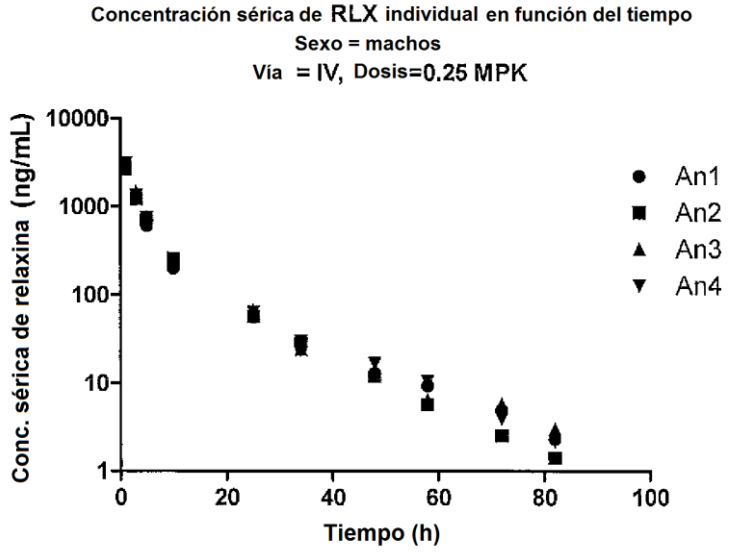


Figura 14A

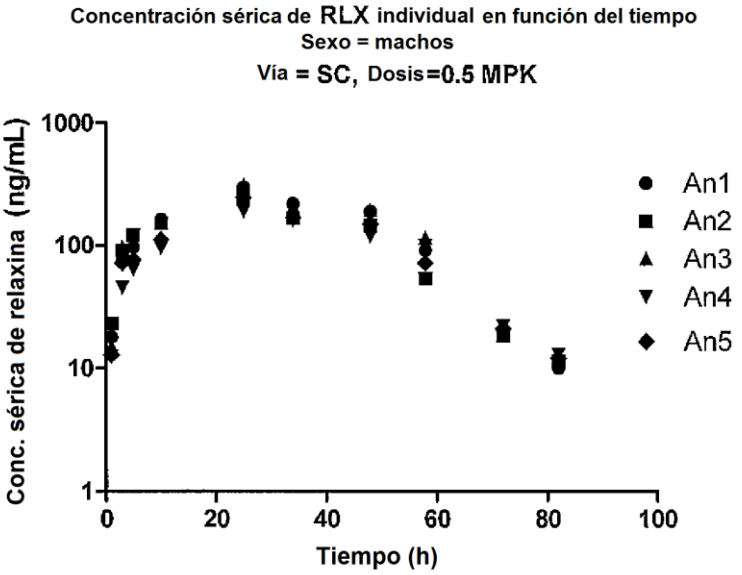


Figura 14B

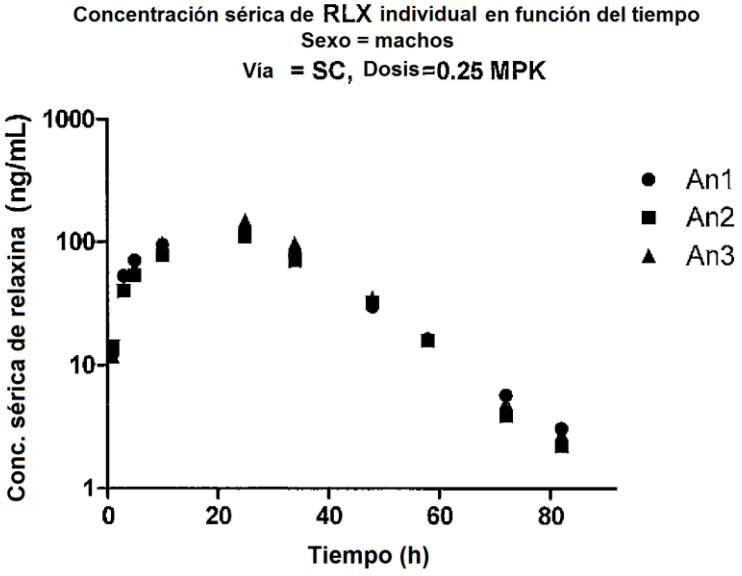


Figura 15

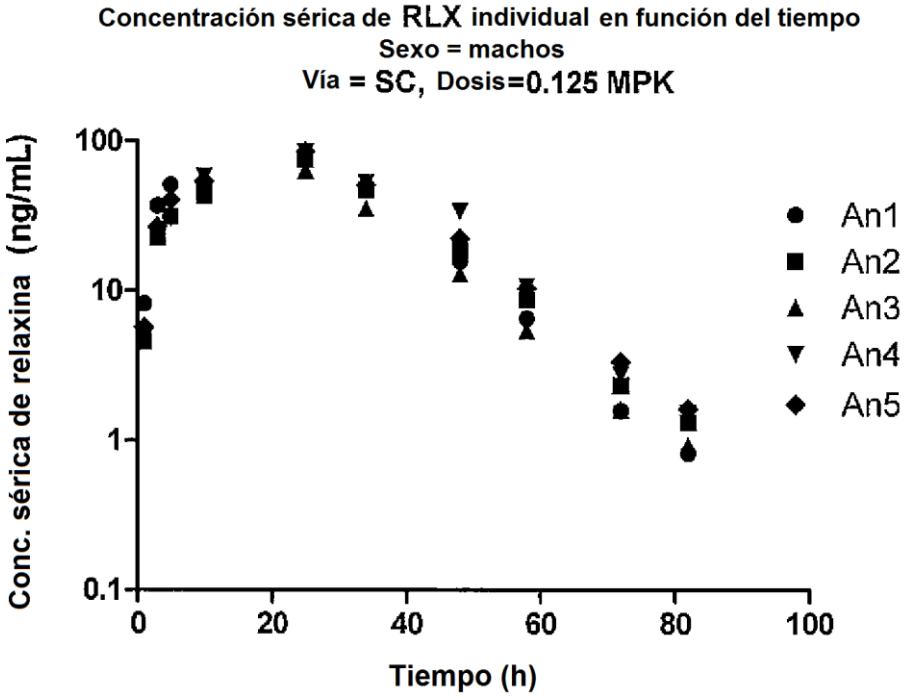

Concentración sérica de RLX individual en función del tiempo
Sexo = machos
Vía = SC, Dosis=0.125 MPK
Conc. sérica de relaxina (ng/mL)
100
10
1
0.1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (h)
An1
An2
An3
An4
An5

Figura 16A

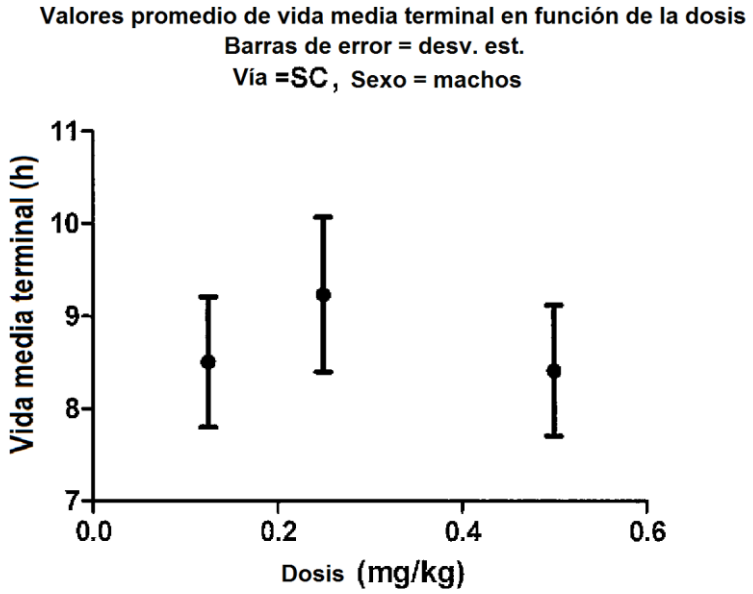


Figura 16B

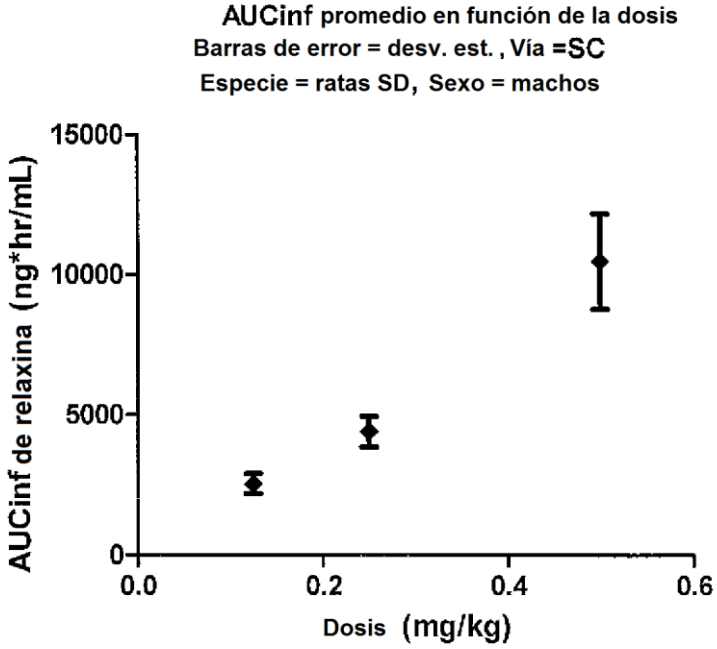


Figura 17A

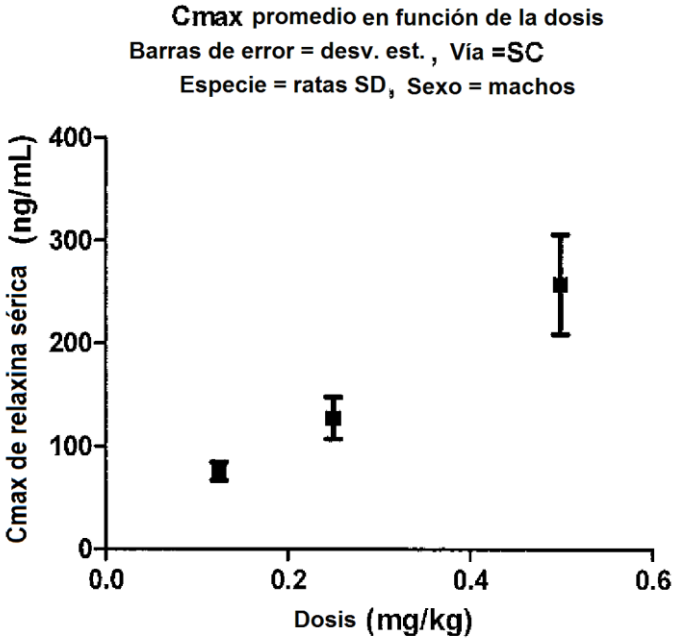


Figura 17B

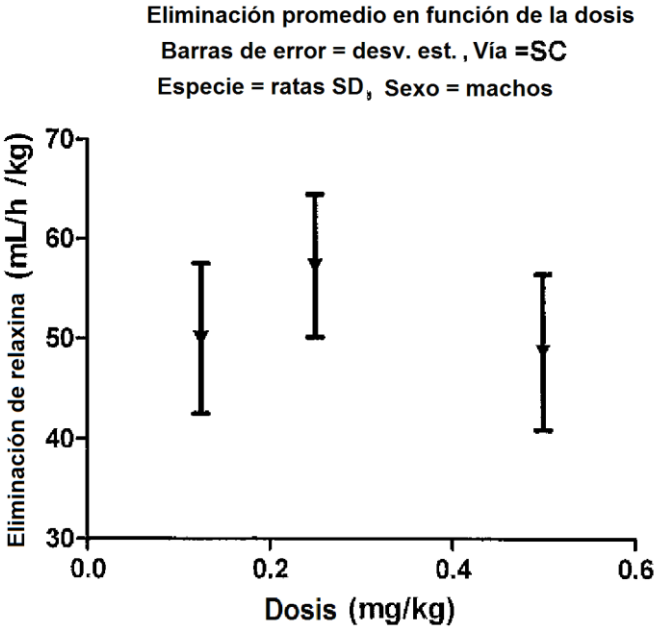


Figura 18A

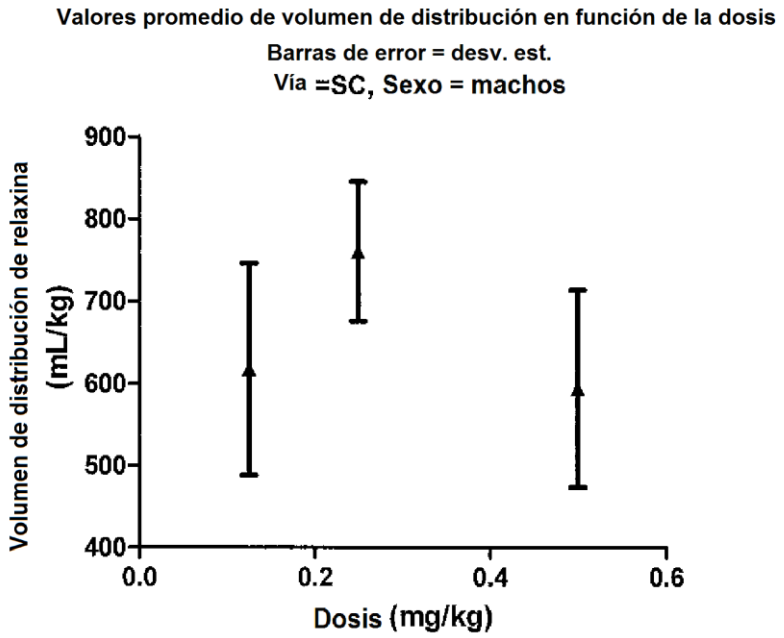


Figura 18B

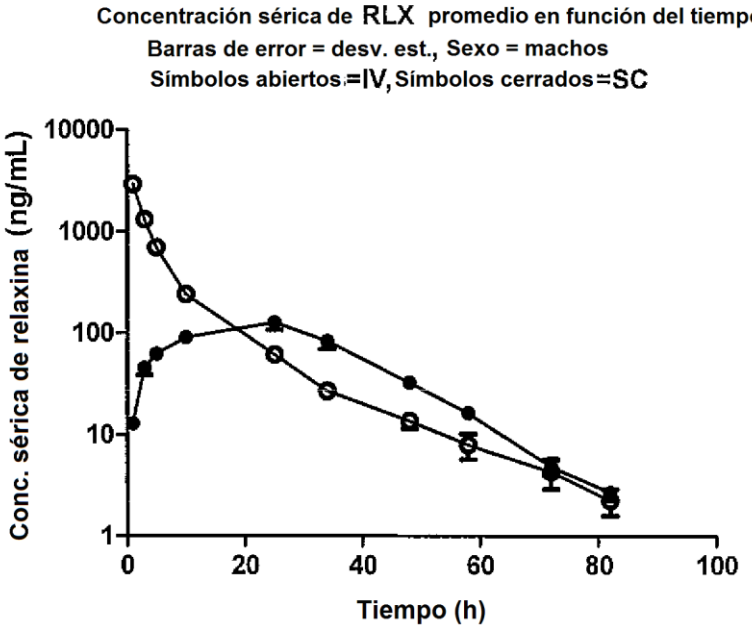


Figura 19, parte A

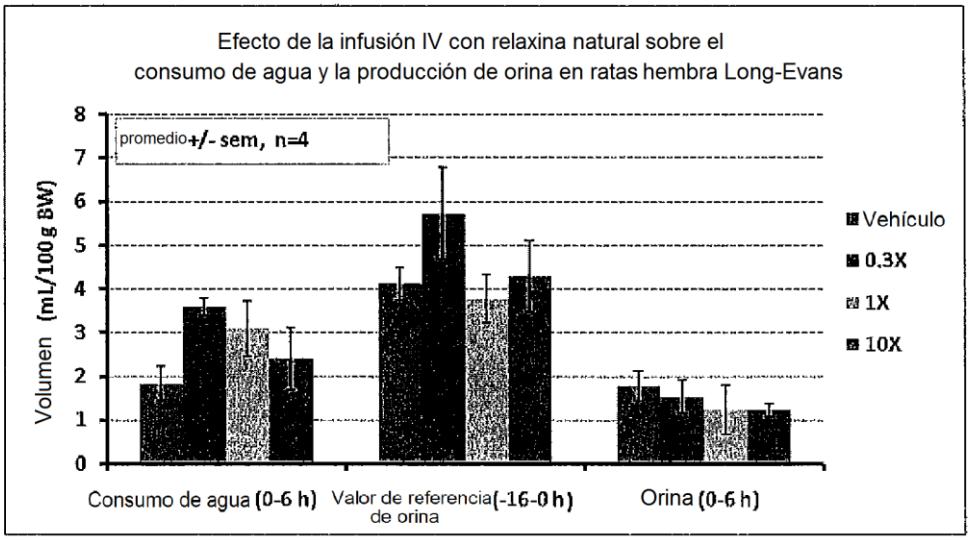


Figura 19, parte B

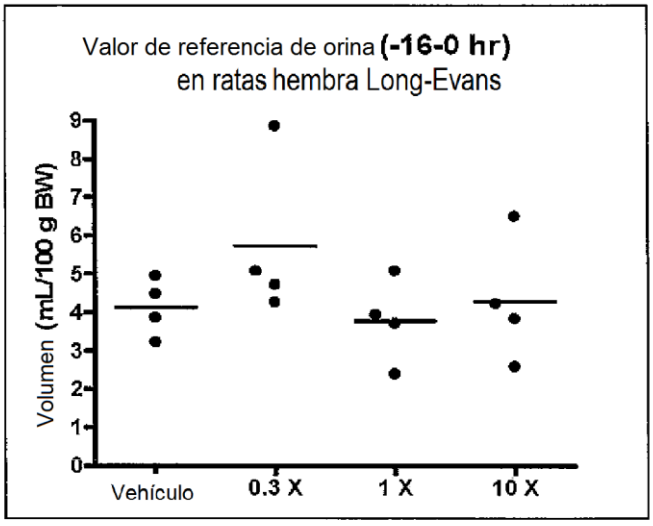


Figura 19, parte C

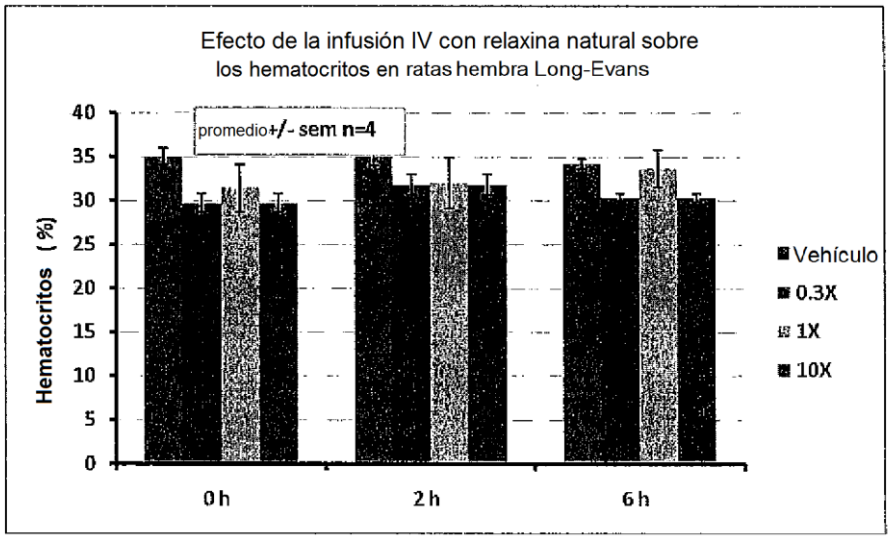


Figura 19, parte D

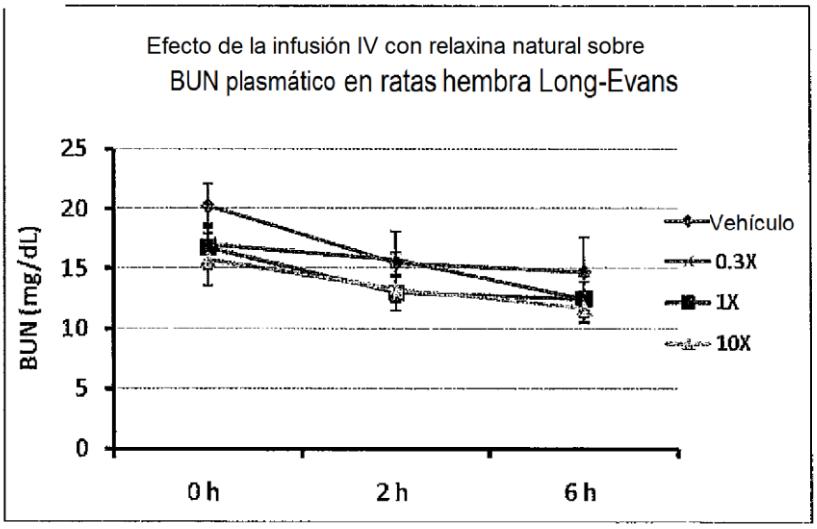


Figura 19, parte E

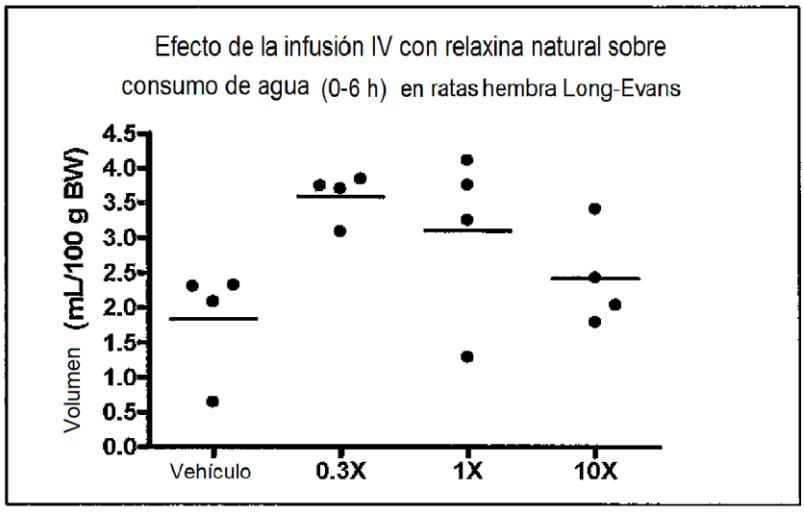


Figura 19, parte F

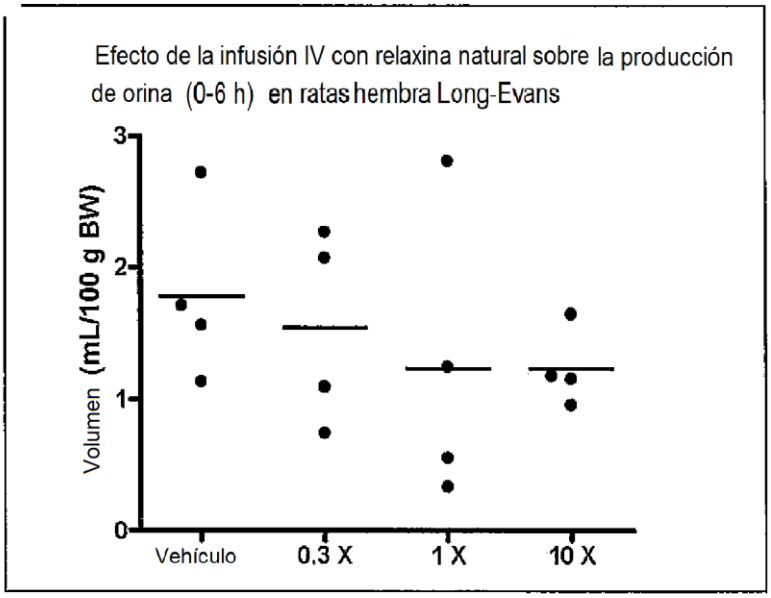


Figura 20, parte A

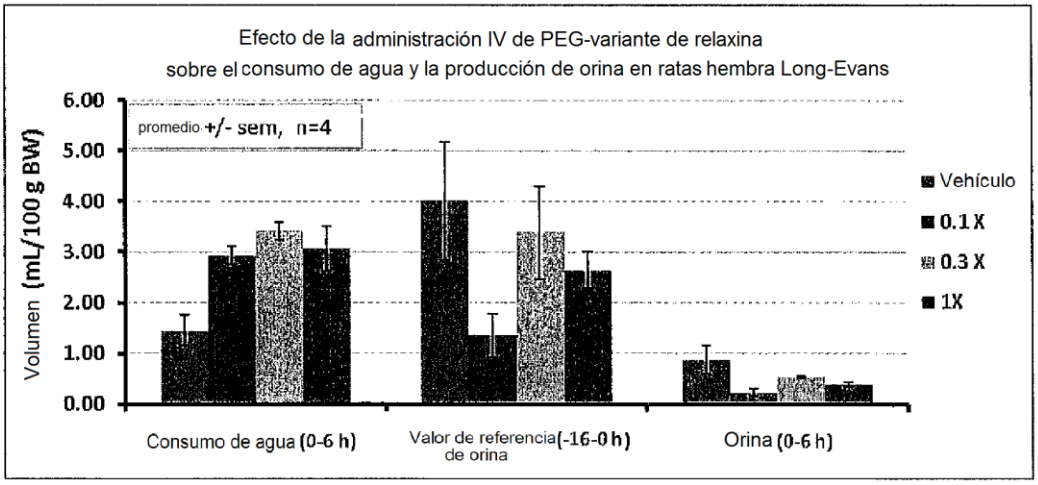


Figura 20, parte B

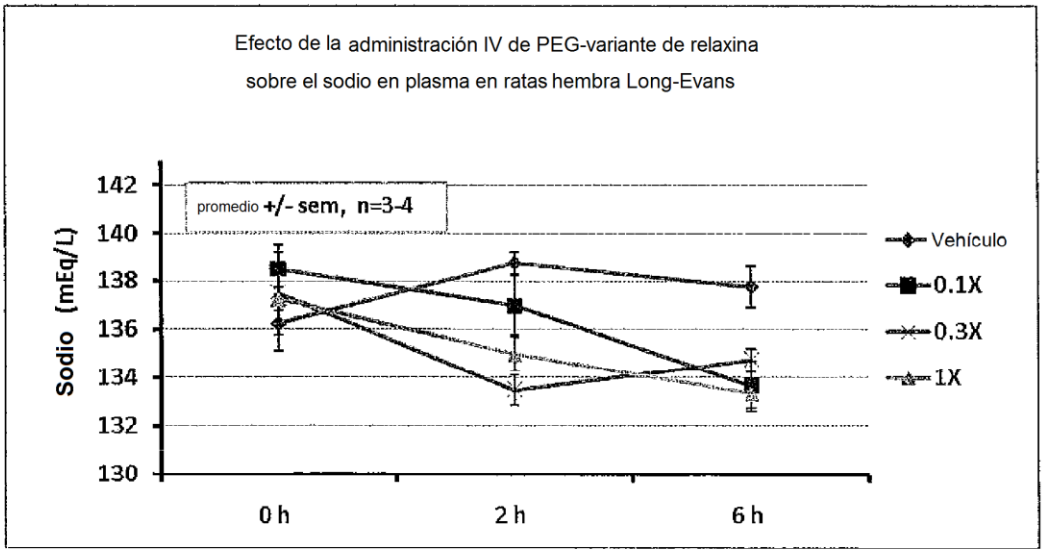


Figura 20, parte C

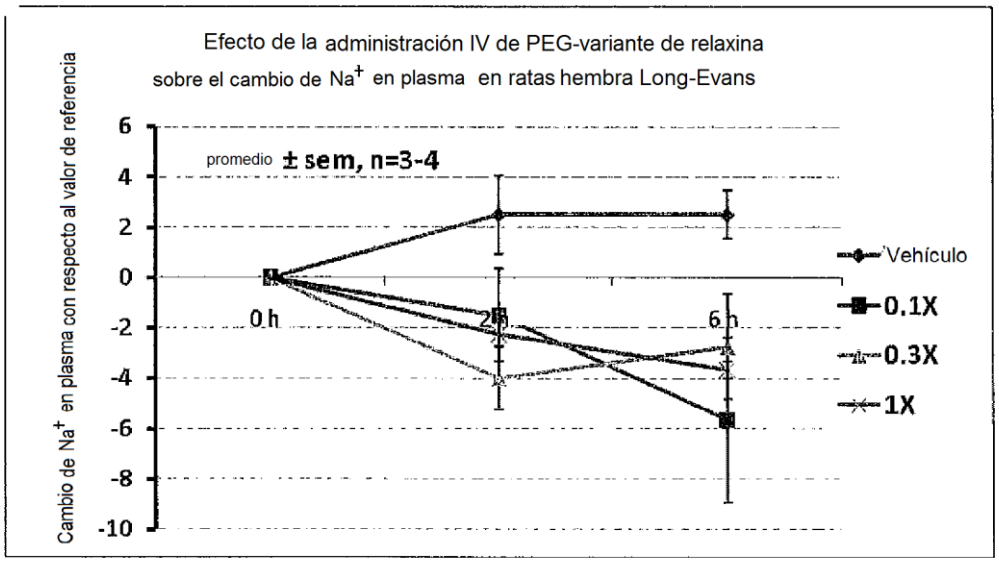


Figura 20, parte D

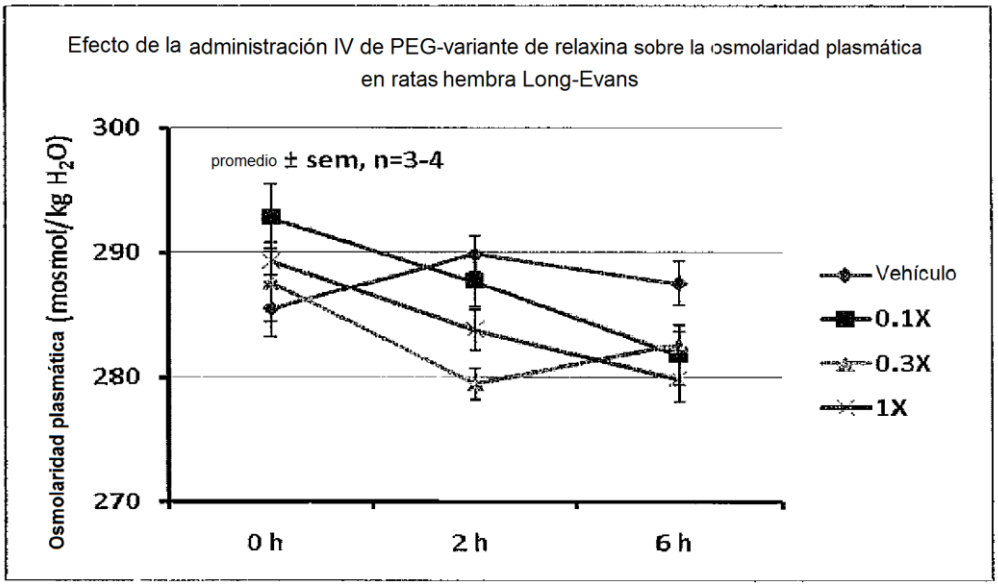


Figura 20, parte E

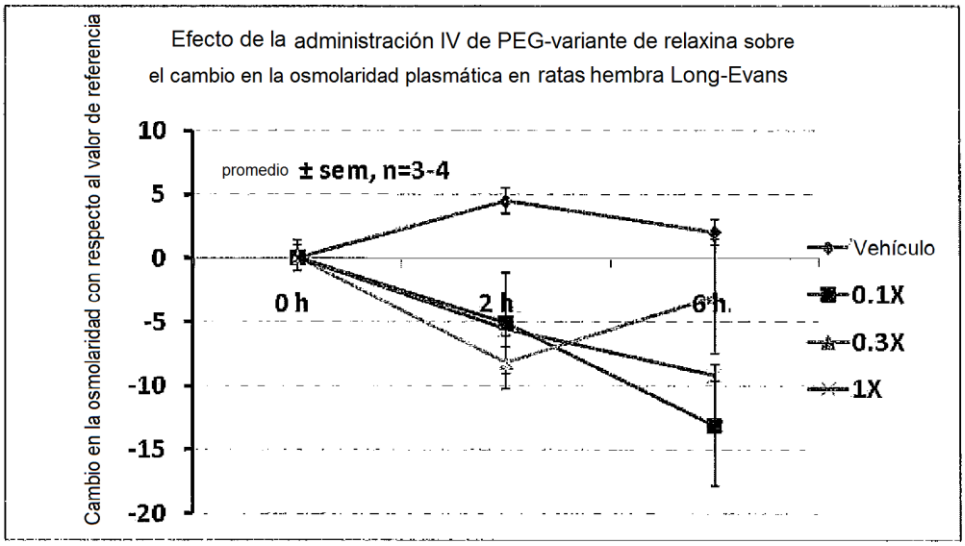


Figura 20, parte F

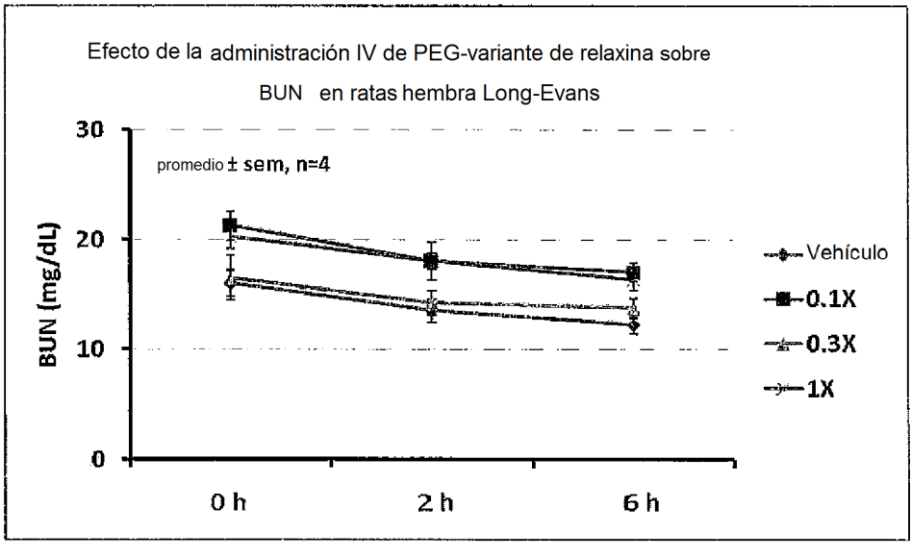


Figura 20, parte G

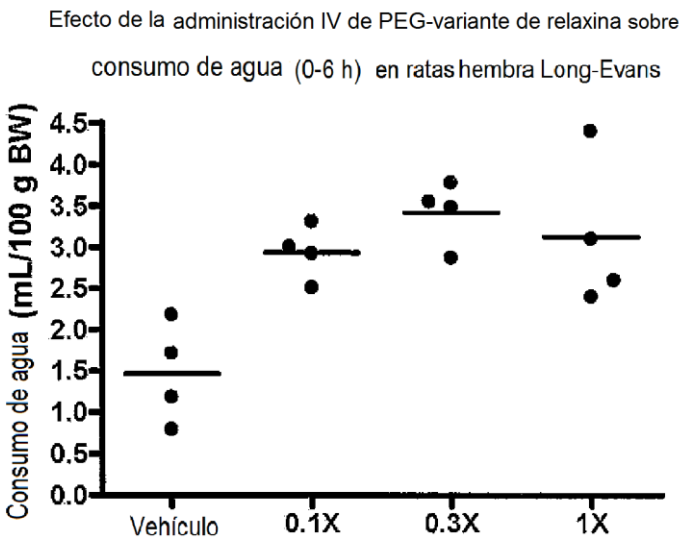


Figura 20, parte H

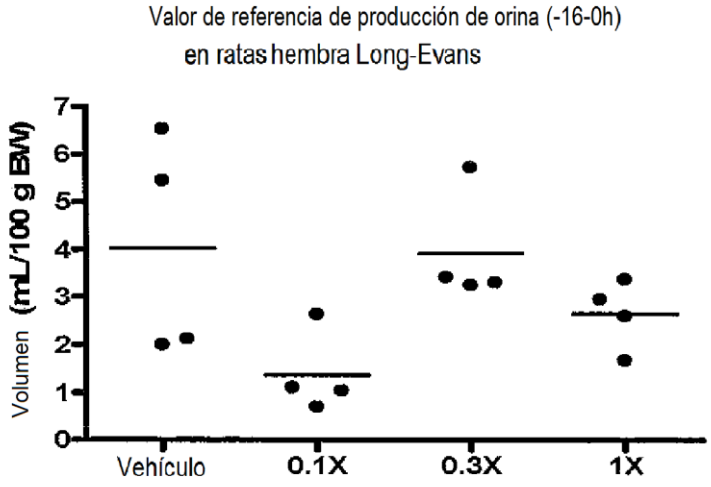
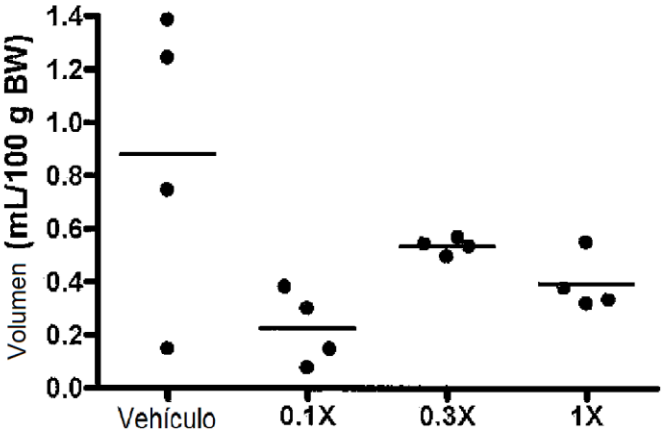


Figura 20, parte I

Efecto de la administración IV de PEG-variante de relaxina sobre la producción de orina (0-6 h) en ratas hembra Long-Evans



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kraynov, Vadim

Knudsen, Nick

Hewet, Amha

de Dios, Kristine

Pinkstaff, Jason

Sullivan, Lorraine

<120> Polipéptidos de relaxina modificados y sus usos

<130> AMBX-0174.00PCT

<150> 61/374,582

<151> 2010-08-17

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile

20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly

35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser

50

<210> 3

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu

20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly

35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg

50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

85

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr

1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

20

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val

1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser

20 25

<210> 7

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly

1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu

20 25 30

Gln Lys Arg

35

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg

1 5

<210> 10

<211> 72

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gc 72

<210> 11

<211> 87

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgcagatt 60

gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87

<210> 12

<211> 159

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120

cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159

<210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgaaaaaga atatcgcatt tcttcttaaa cgg 33

<210> 14

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgattgaag gtggtcgt 18

<210> 15

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu

1 5 10 15

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser

20 25 30

Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu

35 40 45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu

50 55 60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys

65 70 75 80

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

85 90

<210> 16

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintetasa mutante derivada de Methanococcus jannaschii sintetasa

<400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His

145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 17

<211> 77

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ARNt mutante derivado de ARNt de Methanococcus jannaschii

<400> 17

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccgc cggacca 77

<210> 18

<211> 77

<212> ADN

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 18

ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccggcccgc cggacca 77

<210> 19

<211> 88

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un supresor ámbar optimizado ARNt

<400> 19

cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60

gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 20

<211> 89

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un supresor por cambio de marco AGGA optimizado ARNt

<400> 20

gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt 60

cgagggttcg aatccctccc ctcgcacca 89

<210> 21

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-L-fenilalanina

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 22

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de

p-benzoil-L-fenilalanina

<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 23

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr

145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His

165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn

180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys

195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys

210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile

225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu

260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn

275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

290 295 300

Leu

305

<210> 24

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr

145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His

165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn

180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys

195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys

210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile

225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu

260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn

275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

290 295 300

Leu

305

<210> 25

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 25

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr

145 150 155 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His

165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn

180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys

195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys

210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile

225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg

245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu

260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn

275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg

290 295 300

Leu

305

<210> 26

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

<400> 26

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 27

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 27

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 28

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 28

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 29

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

<400> 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His

145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 30

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de

p-acetil-fenilalanina

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His

145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 31

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de p-acetil

-fenilalanina

<400> 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His

145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 32

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de

p-acetil-fenilalanina

<400> 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 33

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de

p-azido-fenilalanina

<400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser

1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala

20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile

50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His

145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

<210> 34

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Aminoacil-ARNt sintetasa para la incorporación de
p-azido-fenilalanina

<400> 34

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp

65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met

85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys

100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys

115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro

130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr

145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile

165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His

180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser

195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala

210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro

225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys

245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu

260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys

275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys

290 295 300

Arg Leu

305

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JUNE 29, 2012

PTAS

JOHN W. WALLEN, III
10975 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037

501973002

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 06/28/2012

REEL/FRAME: 028464/0823
NUMBER OF PAGES: 10

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: AMBX-0174.00PCT

ASSIGNOR:
KRAYNOV, VADIM — DOC DATE: 08/25/2011

ASSIGNOR:
KNUDSEN, NICK — DOC DATE: 04/25/2012

ASSIGNOR:
HEWET, AMHA — DOC DATE: 06/28/2012

ASSIGNOR:
DE DIOS, KRISTINE — DOC DATE: 06/28/2012

ASSIGNOR:
PINKSTAFF, JASON — DOC DATE: 06/05/2012

ASSIGNOR:
SULLIVAN, LORRAINE — DOC DATE: 06/05/2012

ASSIGNEE:
AMBRX, INC.
10975 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CALIFORNIA 92037

APPLICATION NUMBER:
PATENT NUMBER:
PCT NUMBER: US2011048157
TITLE:

FILING DATE:
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

DOCKET NO. AMBX-0174.00PCT

ASSIGNMENT

Serial No.: PCT/US2011/048157
Filed: August 17, 2011

WHEREAS, VADIM KRAYNOV, residing in San Diego, California, NICK KNUDSEN, residing in San Diego, California, AMHA HEWET, residing in Chula Vista, California, KRISTINE DE DIOS, residing in San Diego, California, JASON PINKSTAFF, residing in Encinitas, California, and LORRAINE SULLIVAN residing in San Diego, California (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to:

"MODIFIED RELAXIN POLYPEPTIDES AND THEIR USES"

for which they have on the 17th day of August, 2011 executed an application for Letters Patent of the United States and for patents in foreign countries (including related rights such as utility-model registrations, inventor's certificates, and the like); and

WHEREAS, AMBRX, INC., a corporation of the State of DELAWARE, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title, and interest therein;

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations to their moving, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and does hereby sell, assign, and transfer unto said Assignee the entire right, title, and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all provisional, non-provisional, international, and national stage applications thereof (including related rights such as utility-model registrations, inventor's certificates, and the like) heretofore or hereafter filed for said inventions and discoveries in the United States and any foreign countries, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all United States Letters Patents and foreign patents, that may be granted for said inventions and discoveries, all rights under all available International Agreements, Treaties, and Conventions for the protection of Intellectual property in its various forms in every participating country, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and

enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States, and any officials of foreign countries whose duty it is to Issue Patents on applications as aforesaid, to Issue all patents for said inventions in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that they have a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

And for the consideration aforesaid, Assignors further covenant and agree that they will, whenever requested, but without cost to themselves, promptly communicate to said Assignee or its representatives any facts known to them relating to said inventions and discoveries, testify in any interference or legal proceedings involving said inventions and discoveries, and execute any additional papers that may be necessary to enable said Assignee or its representatives, successors, nominees, or assigns to secure full and complete protection for the said inventions and discoveries or that may be necessary to vest in said Assignee the complete title to the said inventions and discoveries and patents hereby conveyed and to enable it to record said title.

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 25 day of August, 2011.

VADIM KRAYNOV

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 25th day of August, 2011, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared VADIM KRAYNOV, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

Signature
Notary Public

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 25 day of April, 2012.

NICK KNUDSEN

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 25th day of April, 2012, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared NICK KNUDSEN, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____
Notary Public

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 28 day of June, 2012.

AMHA HEWET

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 28th day of June, 2012, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared AMHA HEWET, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____
Notary Public

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set her hand and seal this 28 day of June, 2012.

KRISTINE DE DIOS

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 28th day of June, 2012, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared KRISTINE DE DIOS, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that she executed the same in her authorized capacity, and that by her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____
Notary Public

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 5 day of June, 2012.

JASON PINKSTAFF

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 5th day of June, 2012, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared JASON PINKSTAFF, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____
Notary Public

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set her hand and seal this 05 day of June, 2012.

LORRAINE SULLIVAN

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN DIEGO

On this 5th day of June, 2012, before me, AMY M. SHERIDAN, a Notary Public, personally appeared LORRAINE SULLIVAN, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that she executed the same in her authorized capacity, and that by her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____
Notary Public

AMY M. SHERIDAN
Commission # 1941801
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 19, 2015

(Sello)

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Bajo la Secretaría de Comercio para la Propiedad Intelectual y el

Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

JUNIO 29, 2012

JOHN W. WALLEN, III

10975 NORTH TORREY PINES ROAD

LA JOLLA, CA 92037

501973002

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

AVISO DE INSCRIPCIÓN DE DOCUMENTO DE CESIÓN

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO INSCRITO POR LA DIVISIÓN DE REGISTROS DE CESIONES DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA COMPLETA ESTÁ DISPONIBLE EN EL SALÓN DE BÚSQUEDAS DE CESIONES EN EL NÚMERO DE ROLLO Y ESTANTE INDICADOS ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE INSCRIPCIÓN REFLEJA LOS DATOS EXISTENTES EN EL SISTEMA DE CESIONES DE MARCAS Y PATENTES. SI USTED ENCUENTRA CUALQUIER ERROR O TIENE PREGUNTAS RESPECTO A ESTE AVISO, POR FAVOR CONTACTE LA DIVISIÓN DE REGISTROS DE CESIONES AL TELÉFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE UNA SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, CORREO: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE INSCRIPCIÓN: 06/28/2012 ROLLO/ESTANTE: 028464/0823

NÚMERO DE PÁGINAS: 10

RESUMEN: CESIÓN DE LOS INTERESES DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO PARA LOS DETALLES).

NUMERO DE DOCUMENTO: AMBX-0174.00PCT

CEDENTE:

KRAYNOV, VADIM. FECHA DOC: 08/25/2011

CEDENTE:

KNUDSEN, NICK FECHA DOC: 04/25/2012

CEDENTE:

HEWET, AMHA FECHA DOC: 06/28/2012

CEDENTE:

DE DIOS, KRISTINE FECHA DOC: 06/28/2012

CEDENTE:

PINKSTAFF, JASON FECHA DOC: 06/05/2012

CEDENTE:

SULLIVAN, LORRAINE FECHA DOC: 06/05/2012

CESIONARIO:

AMBRX, INC.

10975 NORTH TORREY PINES ROAD

LA JOLLA, CA 92037

NÚMERO DE SERIE: 12833058 FECHA DE PRESENTACIÓN:

NÚMERO DE PATENTE: FECHA DE EMISIÓN:

NUMERO PCT: US2011048157

TÍTULO:

GERENCIA DE SERVICIOS DE CESIONES

DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN

Serie No.: PCT/US2011/048157

Presentada: Agosto 17, 2011

CONSIDERANDO QUE, VADIM KRYNOV, residente en San Diego, California, NICK KNUDSEN, residente en San Diego, California, AMHA HEWET, residente en Chula Vista, California, KRISTINE DE DIOS, residente en San Diego, California, JASON PINKTAFF, residente en Encinitas, California, y LORRAINE SULLIVAN residente en San Diego, California (de aquí en adelante, "cedentes"), han hecho ciertas invenciones o descubrimientos nuevos y útiles relacionados con:

"POLIPÉPTIDOS DE RELAXINA MODIFICADA"

Para los cuales, el día 17 de agosto de 2011, han presentado Solicitud de Patente Estadounidense y en países extranjeros (incluyendo derechos relacionados tales como registros de modelos de utilidad, certificados de inventores, y similares); y

CONSIDERANDO QUE, AMBRX, INC., una corporación del Estado de DELAWARE, (de aquí en adelante "Cesionarios"), está deseosa de adquirir el derecho completo, título, e intereses de esta;

ENTONCES, POR LO TANTO, SEA CONOCIDO que por y en consideración de la suma de Un Dólar y otras valiosas consideraciones de su movimiento,

cuya recepción reconocemos aquí, los Cedentes hemos vendido, cedido y transferido, y de hecho vendemos, cedemos y transferimos a dicho Cesionario el derecho, título e interés completos en y para todas las dichas invenciones y descubrimientos descritos en dicha solicitud cuya identificación dada arriba mediante número de serie y fecha de presentación, cuando esté disponible se autoriza aquí, y en y para dicha solicitud, todas las solicitudes provisionales, no provisionales, en fase internacional o nacional de la misma (incluyendo derechos relacionados tales como registros de modelos de utilidad, certificados de inventores, y similares) ya presentadas o que se presenten después para dichas invenciones y descubrimientos en los Estados Unidos y en cualesquier país extranjero, todas las sustitucines, divisiones, y continuaciones de las mismas, y en y para todos los títulos de Patente en Estados Unidos y en los países extranjeros, que puedan ser otorgadas a dichas invenciones y descubrimientos, todos los derechos bajo todos los Acuerdos Internacionales, Tratados, y Convenios disponibles para la protección de la propiedad intelectual en sus diversas formas en cada país participante, y en y para todas las extensiones, renovaciones, y reemisiones de las mismas, estas son para que el Cesionario, sus herederos y asignados las posean y disfruten completa y enteramente como si las mismas las poseyeran y disfrutaran los Cedentes si esta Cesión no se hubiera efectuado;

Y los Cedentes autorizan por el presente y solicitan al Comisionado de Patentes de los Estados Unidos, y a los funcionarios en los países extranjeros cuya labor es otorgar Patentes a solicitudes como las mencionadas, para otorgar todas las patentes a dichas invenciones de acuerdo con esta Cesión;

Y en consideración de lo anteriormente dicho, los Cedentes convienen y acuerdan con los Cesionarios que tienen un dominio o título completo y sin trabas de las invenciones y descubrimientos descritos arriba y cedidos aquí, cuya propiedad ellos garantizan para los Cesionarios, sus herederos y asignados;

Y en consideración de lo mencionado arriba, los Cedentes convenimos y acordamos aquí comunicar prontamente, cuando se les requiera, pero sin costo para ellos, a dicho cesionario, o a sus representantes legales de cualesquier hechos conocidos por ellos relacionados con dichas invenciones y descubrimientos, testificar en cualesquier procesos legales o de interferencia que involucren a dichas invenciones y descubrimientos, y firmar todos los documentos adicionales que puedan ser necesarios para permitir que los Cesionarios o sus representantes, herederos, nominados, o asignados aseguren la protección completa de dichas invenciones y descubrimientos o que puedan ser necesarios para conferir a dichos cesionarios el título completo sobre dichas invenciones y descubrimientos y patentes que asociadas y para permitir registrar tal título.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 25 de Agosto de 2011.

(Firmado)

VADIM KRYNOV

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 25 de agosto de 2011, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente VADIM KRYNOV, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 25 de abril de 2012.

(Firmado)

NICK KNUDSEN

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 25 de abril de 2012, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente NICK KNUDSEN, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 28 de junio de 2012.

(Firmado)

AMHA HEWET

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 28 de junio de 2012, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente AMHA HEWET, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 28 de junio de 2011.

(Firmado)

KRISTINE DE DIOS

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 28 de junio de 2012, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente KRISTINE DE DIOS, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 5 de junio de 2012.

(Firmado)

JASON PINKTAFF

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 5 de junio de 2012, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente JASON PINKTAFF, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

EN TESTIMONIO DE LO ANTERIOR, el Cedente ha firmado aquí abajo de su propia mano y colocado el sello este día 5 de junio de 2012.

(Firmado)

LORRAINE SULLIVAN

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN DIEGO

En este día 5 de junio de 2012, ante mí, AMY M. SHERIDAN, Notario Público, compareció personalmente LORRAINE SULLIVAN, quien me demostró sobre la base de evidencia satisfactoria que es la persona cuyo nombre está suscrito en este instrumento y reconoció que lo firmó por su propia voluntad, y que por su firma en este instrumento la persona, o la entidad a la cual representa dicha persona, da validez al instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO según las leyes del Estado de California que el parágrafo anterior es verdadero y correcto.

Como testimonio firmo y pongo el sello oficial.

Firma (firmado)

Notario Público

(sello) AMY M. SHERIDAN

Comisión # 1941801

Notario Público – California

Condado de San Diego

Mi comisión expira el 19 de julio de 2015.

BAKER & McKENZIE

Baker & McKenzie S.A.S.
NIT: 900.034.906-9

Av. 82 No. 10-62 6th Floor
Bogota
Colombia

Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakermckenzie.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

AMBRX, INC.

located at

10975 North Torrey Pines Road, Suite 100 La Jolla, CA 92037, United States of America

declares that it hereby grants to

ÁLVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or RICARDO METKE MENDEZ and/or JUAN PABLO CONCHA-DELGADO and/or OLGA GEORGETTE OTERO

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A members of Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to pursue before the competent authorities the following matters:

Trademark registrations and renewals; deposit and registration of commercial names and commercial ensigns; registration and renewal of domain names; Prosecution and obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits layout-designs and vegetal varieties; recordals of mergers, changes of name, assignments, changes of domicile and address; security interests; liens and other acts that affect or limit the mentioned industrial property rights; filing and prosecution of oppositions; recordal of license of use agreements; filing and prosecution of cancellation actions, annulment actions, annulment and reinstatement of right action, and all judicial actions available for the prosecution of proceedings related to intellectual property matters, unfair competition, and protection of consumers.

to which end it empowers them to file requests, petitions and lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including faculties to enter into settlement agreements, conciliations and transactions, abandon applications and renounce rights and, in general, to take all the actions before the competent authorities in order to duly protect our intellectual property. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the Company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the marks and other intellectual property rights, and to do everything that may be required before administrative or judicial officers of any class to comply this power, giving them likewise faculty to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Done and subscribed in La Jolla, California USA

On the 4th day of Feb. of 2013

John W. Walla, III
Vice President

Signature of the person Issuing the Power

PODER

La abajo firmada,

AMBRX, INC.

domiciliada en

10975 North Torrey Pines Road, Suite 100 La Jolla, CA 92037, Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o RICARDO METKE MÉNDEZ y/o JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o OLGA GEORGETTE OTERO

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A., miembros de Baker & McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las autoridades competentes los siguientes asuntos:

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de nombres de dominio; trámite y obtención de solicitudes de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; inscripción de fusiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de oposiciones; inscripción de licencias de uso; presentación y tramitación de acciones de cancelación; acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho y demás acciones judiciales, relacionadas con procesos de propiedad industrial , competencia desleal y protección al consumidor.

a cuyo efecto los faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar solicitudes y renunciar a derechos, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de marcas y otros derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en

A los días del mes de de 20

Firma de la persona que firma el Poder