



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 261 509**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/113** (2006.01)  
**C07K 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA REVISADA

T4

86 Número de solicitud europea: **01990489 .5**

86 Fecha de presentación : **27.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1337549**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54 Título: **Procedimiento para plegar polipéptidos sintetizados químicamente.**

30 Prioridad: **27.11.2000 EP 00204207**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.11.2006**

45 Fecha de la publicación de la mención de la traducción revisada BOPI: **16.02.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción revisada de patente europea: **16.02.2008**

73 Titular/es: **Lonza AG.**  
**Münchensteinerstrasse 38**  
**4002 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Verdini, Antonio;**  
**Corradin, Giampietro y**  
**Roggero, Mario**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 261 509 T4

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para plegar polipéptidos sintetizados químicamente.

5 La presente invención se refiere un procedimiento para plegar polipéptido sintetizados químicamente. Además, la invención se refiere a un procedimiento para producir proteínas activas biológicamente.

10 Durante última década ha habido un aumento en la demanda de proteínas sintéticas después de la síntesis química exitosa de la proteasa de VIH completamente activa, una enzima de 99 residuos preparada por métodos altamente optimizados de síntesis de péptido en fase sólida (SPPS) basada en el método estándar Boc/Bzl.

15 La síntesis en 1994 de la ubiquitina cristalina, una proteína pequeña que consiste de 76 residuos, ha demostrado adicionalmente que proteínas altamente puras pueden sintetizarse mediante SPPS basándose en el protocolo Fmoc/t-Bu, un método opcionalmente más simple y químicamente menos complejo que el procedimiento Boc/Bzl.

20 En el año 2000, hay una amplia evidencia experimental de que las proteínas con un solo dominio que contienen entre 60 y 100 residuos de aminoácidos pueden producirse rápidamente, de manera confiable y económica mediante la síntesis química, con la asistencia de un sintetizador de péptido, en cantidades que son suficientes para estudios estructurales y funcionales.

25 Las proteínas que contienen puentes disulfuro preparados mediante síntesis química, una vez que se pliegan, tienen las mismas propiedades que las formas naturales y que las formas diseñadas genéticamente. Los puentes disulfuro de las proteínas a partir de estructuras cíclicas sencillas o múltiples intra- y/o intercadena las cuales imparten limitaciones conformacionales considerables a las moléculas, contribuyen así de manera decisiva a la estabilización de la conformación bioactiva.

30 Las proteínas con un solo dominio plegado de estructura conocida pueden prepararse mediante la formación de pares de los residuos de cisteína en regiones selectivas. Se desarrollaron varias combinaciones de grupos protectores de cisteína compatibles con los esquemas de protección comúnmente utilizados que permiten la desprotección y/o co-oxidación paso a paso y par por par de los residuos de cisteína con selectividad completa.

35 Sin embargo, una demostración de qué tan demandante es la química implicada en la formación de pares de los residuos de cisteína en regiones selectivas en proteínas que contienen múltiples residuos de cisteína es la síntesis reciente de un péptido semejante a insulina, relaxina de humano. La síntesis del precursor de la cadena A se lleva a cabo al utilizar los métodos SPPS, el método Fmoc/t-Bu y una resina basada en alcohol p-alcoixibencílico, mientras que el precursor de la cadena B se prepara al utilizar resina PAM (éster de 4-carboxiamidometilbencilo unido a resina basada en poliestireno) al seguir el método Boc/Bzl. De los cuatro residuos de cisteína del precursor de la cadena A, dos estuvieron protegidos como los derivados S-Trt (S-trifenilmetilo), mientras que los otros tuvieron protección S-Acm (S-acetamidometilo) y S-Meb (S-p-metilbencilo), respectivamente. Las dos cisteínas del precursor de la cadena B estuvieron protegidas por los grupos protectores S-Acm y S-Meb. El puente intramolecular S-S de la cadena A se obtuvo primero mediante oxidación de yodo en AcOH. Luego, los dos puentes disulfuro intermoleculares que conectan a las cadenas A y B se obtuvieron en dos pasos: en el primer paso, el tiol libre del precursor de la cadena A, obtenido mediante desbloqueo HF del grupo protector S-Meb, se hizo reaccionar con el residuo Cys (Npys) (S-3-nitro-2-piridin sulfenilo) activado del cadena B (formación dirigida del heterodisulfuro intermolecular), y en el segundo paso, el puente S-S remanente se obtuvo mediante remoción cooxidativa de los grupos S-Acm con yodo.

45 Los protocolos SPPS ofrecen la posibilidad de preparar una variedad de polipéptidos mediante síntesis química, que contienen residuos de cisteína protegidos con el mismo grupo bloqueador (protector). Una vez que los grupos protectores se remueven mediante varios reactivos oxidantes los enlaces disulfuro se forman directamente. Los polipéptidos y/o proteínas que contienen cisteínas protegidas S-Trt o S-Acm pueden plegarse realmente de manera eficiente después del tratamiento con yodo, N-iodosuccinimida y yoduro de cianógeno bajo condiciones de solvente, pH y tiempo de reacción cuidadosamente controladas que minimizarán la modificación de Tyr, Met, y Trp sensible a la oxidación y evitará la sobreoxidación de los tioles de cisteína a los ácidos sulfónicos correspondientes.

55 El trifluoroacetato de talio (III) puede reemplazar a los agentes oxidantes anteriormente mencionados que algunas veces dan mejores rendimientos de los enlaces disulfuro. Las limitaciones principales de este reactivo son su toxicidad, la dificultad para remover talio a partir del polipéptido blanco y la necesidad para proteger a los residuos Met y Trp de la oxidación.

60 Los reactivos de oxidación que contienen una mezcla de compuestos de sulfóxido/sililo y ácido trifluoroacético han sido aplicados exitosamente para la oxidación directa a enlaces disulfuro de precursores de polipéptido que contienen residuos de cisteína S-Acm, S-But, S-Meb y S-Mob (S-p-metoxibencilo). La necesidad para proteger al anillo indol del Trp con formilo para evitar la clorinación bajo condiciones oxidantes es, no obstante, la principal limitación de esta mezcla.

65 Los métodos para el plegamiento oxidativo de precursores politiol lineales, sintéticos (formas polipeptídicas reducidas) son más populares y más frecuentemente aplicados. En el método más simple, los enlaces disulfuro apropiados pueden formarse espontáneamente en la presencia de aire o de algunos otros agentes oxidantes moderados. Además,

## ES 2 261 509 T4

el plegamiento y la formación de pares de cisteína se obtienen tanto en la presencia de las formas reducidas (RSH) como oxidadas (R-S-S-R) de un compuesto sulfhidrido de bajo peso molecular.

5 En los polipéptidos sintéticos y proteínas pequeñas que consisten de un solo dominio, la fuerza de dirección termodinámica para el plegamiento que resulta a partir una combinación de enlaces de H, formación de pares iónicos y efectos hidrófobos por lo visto es suficientemente substancial para producir espontáneamente los isómeros nativos en oxidación renaturalizante aleatoria.

10 A partir de estudios del plegamiento oxidativo de múltiples proteínas pequeñas que contienen cisteína, semejantes a inhibidores de enzimas, toxinas u hormonas, se han derivado informaciones útiles acerca de los motivos estructurales particulares por ejemplo cisteína estabilizada por giro- $\beta$ , cisteína estabilizada por plegamiento de la hélice poli (Pro)-II y cisteína estabilizada por plegamiento estructural  $\alpha$ - $\beta$ , cuya estabilización es la fuerza de dirección principal para la formación correcta de puentes disulfuro incluso en moléculas peptídicas relativamente pequeñas. Si se presta atención a la elección de reguladores de pH, temperatura y aditivos que estabilizarán los motivos estructurales secundarios, entonces incluso se puede obtener *in vitro* plegamiento correcto completo de proteínas parcialmente plegadas o mezcladas (plegadas de manera errónea).

15 Se han diseñado varios protocolos de plegamiento para las especies polipeptídicas politiol para minimizar la formación incorrecta de pares de cisteína intramolecular que lleva a isómeros no nativos, plegados de manera errónea y a evitar tanto como sea posible la formación aleatoria de enlace disulfuro intermolecular que promueve la agregación y precipitación.

20 Así, la oxidación por aire generalmente se lleva a cabo a una dilución elevada de la forma politiol precursora (1 mg/ml o por debajo de esta) bajo condiciones neutras o ligeramente alcalinas. Esta usualmente requiere una larga duración y produce un subproducto no dañino tal como agua en la reacción. Las oxidaciones por aire son, no obstante, difíciles de controlar debido a cantidades traza de iones metálicos que influyen fuertemente sus velocidades. De manera más importante, las moléculas precursoras básicas e hidrófobas tienden a agregarse y a precipitarse fuera de la solución en o cerca de sus puntos isoeléctricos básicos o neutros durante el procedimiento de plegamiento. Además, los productos laterales debidos a la oxidación de Met se acumulan durante el plegamiento. Aunque el número de operaciones químicas necesarias para plegar precursores de politiol se reduce a un mínimo, la formación de puentes disulfuro promovida por el oxígeno molecular del aire da en muchos casos rendimientos bajos, y en algunas ocasiones no ocurre del todo.

25 DMSO y ferricianuro de potasio también han sido utilizados como oxidantes. El ferricianuro de potasio debe, no obstante, ser utilizado en la oscuridad y, si Met o Trp están presentes en la cadena polipeptídica, los productos laterales de oxidación se acumulan durante el plegamiento. El uso de DMSO frecuentemente da mejores resultados debido al hecho de que los plegamientos oxidativos pueden ser conducidos bajo condiciones ácidas a una velocidad eficiente sin productos dañinos en la reacción. El método es particularmente adecuado para plegamiento de precursores de polipéptidos básicos e hidrófobos debido a las características de mayor solubilidad de las especies que se someten a oxidación en reguladores de pH ácidos. Sin embargo, frecuentemente han sido reportados los problemas para remover el DMSO a partir del producto final y la reducción en la selectividad de la formación de puentes disulfuro. Además, la mezcla de los puentes disulfuro que lleva a isómeros plegados de manera errónea y la oligomerización no pueden evitarse siempre incluso con un control cuidadoso de las condiciones experimentales.

30 Los mayores rendimientos de formación de pares de cisteína y plegamiento correctos en precursores de politiol de proteína pequeña se obtienen más frecuentemente mediante el uso de reguladores de pH redox tales como glutatona oxidada (GSSG) y reducida (GSH) y cisteína/cisteína (Cys/Cys).

35 Así, durante los plegamientos oxidativos de la Ribonucleasa A (R.R. Hantgan *et al.* Biochemistry 13, 613, 1974), el dominio nuclear de 49 aminoácidos de hirudina (B. Chatrenet y J.Y. Chang J. Biol. Chem. 267, 3038, 1992) y el Inhibidor de la Tripsina Pancreática de Bovino (BPTI) (T.E. Creighton Methods Enzymol. 131, 83, 1986) inducidos por GSSG/GSH o Cys/Cys, se forman y se reforman constantemente sulfhidrilos libres y grupos disulfuro durante todo el procedimiento de plegamiento. Las velocidades y rendimientos generales usualmente son mejores que el plegamiento oxidativo en el aire debido a que el intercambio de tiol/disulfuro ocurre a través de intermediarios de tiolato que facilitan el recambio del disulfuro no nativo por los naturales. En cuanto al plegamiento oxidativo en aire, la elevada dilución del precursor de politiol es necesaria para evitar la agregación, formación de oligómeros y polímeros y para maximizar los rendimientos de las especies de proteína blanco.

40 Durante la primera etapa del plegamiento de hirudina1-49 *in vitro*, el plegamiento procede de manera secuencial e irreversible a partir de la forma no plegada, reducida (politiol) hacia isómeros equilibrados que contienen uno y dos puentes disulfuro y hacia especies equilibradas que contienen tres enlaces disulfuro (isómeros mezclados) (J. Y. Chang Biochem. J. 300, 643, 1994). Casi todas las 75 especies de proteínas posibles, que incluyen a la proteína nativa, han sido identificadas: 15 isómeros con un puente S-S, 45 isómeros con dos puentes S-S y 15 isómeros con tres puentes S-S. Durante la segunda etapa del plegamiento, las especies mezcladas se reorganizan mediante recambio de los disulfuros no nativos para conseguir las especies de proteína nativa. La formación del disulfuro se promueve principalmente mediante la glutatona oxidada o cisteína, mientras que el recambio del disulfuro requiere un catalizador tiol por ejemplo glutatona reducida o cisteína o mercaptoetanol.

## ES 2 261 509 T4

La efectividad de los reactivos tiol para promover el recambio evidentemente está relacionada con su potencial redox y cada catalizador exhibe una concentración óptima. Cisteína/cisteína es aproximadamente 10 veces más potente que GSSG/GSH en el procesamiento de la acumulación de Hirusinas mezcladas. Esta diferencia ha sido explicada mediante el potencial redox relativo de los sistemas GSSG/GSH (-0.24 V) y Cys-Cys/Cys (-0.22 V). Mediante la selección de una combinación de condiciones óptimas (temperatura, regulador de pH, sales y mezcla redox) el procesamiento de plegamiento de Hirusina1-49 se acelera hasta el grado que alcanza su término en 15 minutos.

En general, la conformación nativa de una proteína sintética que contiene varios enlaces disulfuro debe formarse espontáneamente bajo condiciones óptimas para plegamiento de formas politiol. En muchos casos, sin embargo, incluso en condiciones optimizadas los plegamientos oxidativo mediados por los reguladores de pH redox anteriormente mencionados se produce una cantidad considerable de subproductos y formas mal emparejadas. Este es particularmente el caso en las proteínas que tienen a formar la conformación nativa solamente en la superficie de membranas específicas o bajo asistencia de un chaperón molecular específico (S. Sakakibara *Biopolymers*, Peptide Science 51, 279, 1999).

Además, a pesar de su amplio uso, la mayoría de los plegamientos oxidativos de los precursores politiol promovidos por aire o los pares redox GSSG/GSH y Cisteína/cisteína han sido conducidos en una manera de ensayo y error, como se demuestra claramente por los experimentos de plegamiento de quimiocina sintética y análogos de quimiocina. De hecho, mientras que las quimiocinas nativas y varios de sus análogos se pliegan fácilmente, la estructura plegada se estabiliza por dos o tres puentes disulfuro, varios análogos no se pliegan bien bajo las mismas condiciones que las moléculas nativas correspondientes lo que resulta en formas parcialmente plegadas. Estas observaciones representan una fuerte indicación de que los cambios en la estructura primaria de los precursores politiol pueden afectar de manera adversa la inducción de los pliegues locales correctos (giros- $\alpha$ , motivos helicoidales poliprolina, etc.) en las cadenas polipeptídicas a ser plegadas. Por lo tanto, la propensión a plegarse de muchos precursores tiol es principalmente una propiedad intrínseca de la cadena polipeptídica más que una función del sistema de oxidación específico que actúa sobre las moléculas.

También ha sido reportado el mejoramiento de la formación de pares disulfuro seleccionados mediante la adición de alcoholes, acetonitrilo y DMSO a reguladores de pH a baja fuerza iónica. Esta estrategia implica el mejoramiento de la formación de enlaces disulfuro específicos mediante el ajuste de factores electrostáticos en el medio para favorecer la yuxtaposición de aminoácidos cargados de manera opuesta que limitan los residuos de cisteína seleccionados. Las enzimas tales como peptidil disulfuro isomerasa (PDI) y prolil isomerasa (PPI) también han sido empleadas como aditivos para catalizar y modular el intercambio de disulfuro. El tiempo requerido para plegar Hirusina *in vitro* puede acortarse de 10 h a 30 seg si se añade PDI al regulador de pH para replegamiento. En este caso, la eficiencia del plegamiento *in vitro* no difiere significativamente de la observada *in vivo*.

Los precursores polipéptido politiol se obtienen directamente mediante escisión acidolítica de polipéptido-resina cuando los residuos de cisteína están protegidos por grupos de ácido lábil, por ejemplo Trt. Alternativamente y de manera preferible, los polipéptidos en los que todas las cisteínas están protegidas por un grupo resistente a ácido, por ejemplo el grupo acetamidometilo (Acm), se aíslan primero como derivados de S-cisteína mediante escisión acidolítica de péptido-resina y luego el grupo Acm se elimina mediante tratamiento con Hg (AcO)<sub>2</sub> en ácido acético, seguido por la remoción de iones Hg mediante filtración en gel en la presencia de un gran exceso de mercaptoetanol.

En ambos casos, sin embargo, se ha reportado que ocurren varias reacciones laterales en los residuos de cisteína y de triptofano. El anillo indol de triptofano puede derivarse mediante mercaptoetanol y cisteína que da varias reacciones laterales, la más importante es la oxidación y alquilación por cationes t-butilo durante la remoción acidolítica de la cadena polipeptídica a partir de la resina.

Así, debido a los inconvenientes de las metodologías existentes existe una necesidad para procedimientos más eficientes y más simples para plegar polipéptidos sintetizados químicamente, y preparar proteínas activas biológicamente mediante síntesis química.

El objetivo de la presente invención es por lo tanto el proveer un procedimiento efectivo, simple y rápido para plegamiento de polipéptidos y/o proteínas, en donde se minimiza entre otros la formación de isómeros que contienen puentes disulfuro mal emparejados, y se puede omitir el uso de reactivos costosos para recambio de disulfuro tales como glutatona o enzimas, y cuyo método es repetible, sólido y capaz de ser escalable. Estos y otros objetivos serán evidentes a los expertos en la técnica.

Además, se provee un procedimiento para la preparación de proteínas activas biológicamente, que comprende

- (a) sintetizar químicamente un polipéptido que comprende dos o más residuos de cisteína derivados;
- (b) tratar a este polipéptido con un agente reductor en un regulador de pH para plegamiento que tiene un pH y temperatura predeterminados, y
- (c) purificar las proteínas plegadas obtenidas.

## ES 2 261 509 T4

Así, de conformidad con la invención, se ha encontrado, de manera inesperada, que las cisteínas derivadas de S-t-Bu pueden ser desprotegidas, es decir, al perder la porción S-t-Bu, mientras que forman puentes disulfuro con otras cisteínas cuando se incuban en un regulador de pH para plegamiento apropiado a temperatura y pH adecuados.

5 De conformidad con la presente invención, el agente reductor preferiblemente está libre de cisteína. Un exceso de cisteína puede añadirse al regulador de pH (como por ejemplo se ilustra en los ejemplos 1-5) o la cisteína puede ser derivada a partir de dentro del polipéptido (como se ilustra en el ejemplo 6).

10 En una modalidad preferida del procedimiento de la invención el regulador de pH para plegamiento comprende una u más sales caotrópicas, con el objeto de conducir al polipéptido en condiciones de equilibrio que permiten que ocurra el plegamiento natural. Esto puede lograrse, por ejemplo, al colocar al polipéptido y/o proteína en condiciones completamente desnaturizantes, por ejemplo mediante una elevada concentración de las sales caotrópicas, y luego al diluir la sal caotrópica a una concentración menor para plegamiento. Las sales caotrópicas preferiblemente se eligen a partir del grupo que consiste de cloruro de guanidinio y urea, y preferiblemente están presentes en una concentración de 0.1-1 M durante el plegamiento.

15 Preferiblemente, la temperatura del regulador de pH para plegamiento se encuentra entre 25° y 40°C, más preferiblemente entre 27° y 38°C, con el objeto de disminuir los cambios de degradación peptídica, a la vez que corresponde a las temperaturas naturales del cuerpo. Más preferiblemente la temperatura es de aproximadamente 37°C durante el plegamiento.

20 De conformidad con otra modalidad preferida del procedimiento de la invención el regulador de pH para plegamiento tiene un pH ligeramente alcalino. Preferiblemente, el pH se encuentra entre 7 y 9, más preferiblemente entre 7 y 8.5 con el objeto de promover el procedimiento de plegamiento. Como puede estar claro a partir de lo anteriormente expuesto, el plegamiento de proteína es dependiente de una serie de interacciones complejas. La reacción con cisteína, por ejemplo, no ocurre a un pH ácido y elevados valores de pH incrementan el riesgo de degradación del polipéptido.

25 Después del plegamiento, las proteínas blanco pueden purificarse por métodos bien conocidos en la técnica que incluyen la cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía en fase reversa, cromatografía por afinidad, cromatografía de interacción hidrófila/ intercambio catiónico (HILIC/CEC), cromatografía por desplazamiento (DC) y cromatografía por desplazamiento de muestra (SDM). Más preferiblemente, se emplean la cromatografía de alta resolución (fase reversa) en elución así como la cromatografía por desplazamiento.

30 En una modalidad preferida del procedimiento para producir proteínas activas biológicamente, el procedimiento comprende los pasos de

(a) ensamblar un polipéptido S-t-butil-tio cisteína sobre un soporte polimérico insoluble mediante elongación de cadena paso a paso;

40 (b) escindir la cadena polipeptídica de S-t-butil-tio cisteína a partir del soporte mediante acidólisis;

(c) purificar el polipéptido S-t-butil-tio cisteína obtenido;

45 (d) plegar el polipéptido S-t-butil-tio cisteína purificado mediante el tratamiento de estos polipéptidos con un exceso molar de cisteína en un regulador de pH para plegamiento que comprende una sal caotrópica, preferiblemente cloruro de guanidinio, y que tiene un pH alcalino y una temperatura de aproximadamente 37°C; y

50 (e) purificar las proteínas plegadas obtenidas mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

55 En una modalidad ventajosa del procedimiento de la invención, el soporte polimérico es una poliamida o resina basada en poliestireno funcionalizada con el aglutinante de ácido lábil ácido hidroximetilfenoxiacético, puesto que estos soportes pueden ser utilizados de manera adecuada para sintetizadores peptídicos completamente automatizados, y generalmente permiten la síntesis de cadenas polipeptídicas largas.

60 Como se explicó anteriormente, la presente invención se basa en el ensamblaje en fase sólida paso a paso de polipéptidos S-t-butil-tio cisteína y el hallazgo de que cantidades considerables de proteínas nativas, activas biológicamente pueden producirse al someter a estos polipéptidos a plegamiento en la presencia de un agente reductor, preferiblemente cisteína, a un pH ligeramente por arriba de la neutralidad y a una temperatura de aproximadamente 37°C.

65 Se ha encontrado sorprendentemente que la producción de proteínas activas biológicamente se logra con un exceso molar elevado de cisteína en un procedimiento que remueve el grupo protector S-t-butilo mientras que se permite la formación de un puente disulfuro. Este procedimiento es más simple y más eficiente que los procedimientos descritos en la técnica precedente para el plegamiento de polipéptidos que contienen cisteína los cuales se obtienen mediante síntesis química. La remoción de S-t-but ocurre así en el mismo paso que el plegamiento del polipéptido.

## ES 2 261 509 T4

Alternativamente, el mismo material plegado también puede obtenerse mediante el uso de una combinación de S-t-butil-tio cisteína y cisteína protegida con grupos de ácido lábil adecuados en posiciones seleccionadas de la cadena polipeptídica para forzar la formación de los enlaces disulfuro apropiados sin la adición extra de un agente reductor al regulador de pH para plegamiento. En este caso los grupos de ácido lábil se remueven cuando el péptido se escinde a partir de la resina a pH ácido. Las cisteínas libres se generan así, las cuales a su vez actúan como un “agente reductor” intramolecular para permitir la remoción de S-t-butilo y la formación de disulfuro (como se ilustra en el ejemplo 6).

La esencia de la presente invención se basa en:

- 10 - ensamblaje rápido de las cadenas polipeptídicas S-tio-t-butiladas sobre el soporte polimérico;
- intercambio de los derivados de disulfuro-tiol catalizado por cisteína en condiciones ligeramente alcalinas que conducen a los polipéptidos cisteinilados que son las formas macromoleculares oxidadas (proteína-S-S-cisteína; polipéptido-S-S-cisteína) del par redox clásico Cisteína/Cisteína;
- 15 - la concentración de la forma macromolecular oxidada que permanece constantemente a una baja durante todo el procedimiento de plegamiento de manera que se minimiza el intercambio del disulfuro intermolecular; y
- 20 - ausencia de agregación de intermediarios plegados de manera errónea debido a la formación preferencial y rápida de formas con formación correcta de pares de cisteína (estructura nativa).

De conformidad con el procedimiento para plegamiento de polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, en el primer paso, 10 mg del derivado S-t-butilo se disuelve a temperatura ambiente en 1 ml de un regulador de pH, pH 8.0, que comprende 6M de cloruro de guanidinio, 10 mM de Tris y 0.1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y la solución resultante se mantiene a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. En el segundo paso, la solución se diluye inicialmente 10 veces con agua a un pH de 7.2, (0.6 M de cloruro de guanidinio, 1.0 mM de Tris, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y una concentración final del derivado de polipéptido a 1 mg/ml) y luego se añade un gran exceso molar de cisteína (aproximadamente 100 veces sobre la concentración del polipéptido o derivado de proteína) bajo agitación. La temperatura se incrementa gradualmente a 37°C y se mantiene constante por aproximadamente 24 h con el objeto de permitir que ocurra el plegamiento del polipéptido.

El procedimiento de plegamiento de la presente invención resulta en un producto altamente homogéneo y es aplicable, solamente con modificaciones menores, a cualquier polipéptido que se produce mediante síntesis química en fase sólida como el derivado de cisteína tio-t-butilo. Además, el procedimiento de conformidad con la invención tiene numerosas ventajas adicionales sobre el procedimiento de la técnica precedente, al emplear formas de politiol precursor, tales como

- 35 - los residuos de cisteína de la cadena no están aquilatados durante la escisión acidolítica del polipéptido-resina;
- 40 - tanto la sobreoxidación de la cisteína hacia ácido sulfúrico como la oxidación lleva a que no ocurra la formación de puente disulfuro intermolecular;
- se evita el riesgo de derivación del anillo indol de Trp por mercaptoetanol, el cual es necesario para eliminar los iones Hg contaminantes derivados a partir del desbloqueo de Acm con Hg (AcO)<sub>2</sub>. De hecho el tiolato de cisteína en la mezcla para plegamiento de la presente invención no modifica el Trp del todo;
- 45 - los residuos Met, Trp y Tyr sensibles a oxidación no se modifican durante el plegamiento;
- los costos de producción de los productos finales de plegamiento generalmente son más bajos en comparación con aquellos que emplean polipéptidos politioles y reguladores de pH tipo redox.
- 50

Será evidente a aquellos expertos en la técnica que, a pesar de que las proteínas blanco generalmente se preparan con un elevado rendimiento al utilizar el procedimiento de la presente invención, en algunos casos, por ejemplo en el caso de las proteínas complejas con múltiples enlaces disulfuro, una cierta población de formas intermediarias que no se ha desarrollado completamente hacia la estructura nativa (especies plegadas de manera errónea) puede permanecer en la solución en equilibrio. Las especies plegadas de manera errónea pueden separarse fácilmente a partir de las especies correctamente plegadas mediante RP-HPLC y someterse de nuevo a las condiciones para plegamiento de la presente invención para incrementar el rendimiento general del procedimiento.

De conformidad con la invención, el término polipéptido se refiere un polímero de aminoácidos que se unen mediante enlaces amida. El término proteína se refiere a las especies polipeptídicas en su forma tridimensional, como ocurren en las células y fluidos biológicos de los organismos vivos. Las proteínas pueden consistir por ejemplo de cadenas polipeptídicas con un solo plegamiento o pueden ser estructuras complejas que consisten de cadenas polipeptídicas con múltiples plegamientos.

Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar la presente invención y no se pretende que limiten la invención más allá de las limitaciones establecidas en las reivindicaciones.

## ES 2 261 509 T4

La figura 1 muestra el perfil de HPLC antes de la remoción de S-t-Butilo y del plegamiento de hu-I-309 (ejemplo 4).

La figura 2 muestra el resultado de la determinación de masa del producto de la figura 1.

La figura 3 muestra el perfil de HPLC de hu-I-309 desprotegida, plegada (ejemplo 4), que demuestra un tiempo de retención más corto.

La figura 4 muestra el resultado de la determinación de masa del producto de la figura 3.

La figura 5 muestra el resultado de la determinación de masa del producto ilustrado en la figura 3, después del tratamiento con NEM. No se observó ningún cambio en la masa en comparación con la figura 4, que indica la ausencia de grupos -SH libres.

La figura 6 es una gráfica de la comparación entre la actividad biológica de la I-309 recombinante y la I-309 sintética, plegada de la presente invención. La actividad biológica se evaluó mediante la unión de la quimiocina, marcada con <sup>125</sup>I, a los linfocitos de humano.

La figura 7 muestra el perfil analítico del HPLC de la proteína del ejemplo 5 después del plegamiento.

La figura 8 muestra el perfil preparativo de HPLC de la proteína plegada del ejemplo 5.

La figura 9 muestra el resultado de la determinación de masa del producto purificado del ejemplo 5, que demuestra el peso molecular esperado.

La figura 10 muestra el perfil de HPLC del polipéptido del ejemplo 6 antes de la remoción de S-t-Butilo y del plegamiento.

La figura 11 muestra el resultado de la determinación de masa del polipéptido de la figura 10 (M=H).

La figura 12 muestra el perfil de HPLC de la proteína del ejemplo 6 después del plegamiento, que demuestra un tiempo de retención más corto.

La figura 13 muestra el resultado de la determinación de masa de la proteína de la figura 12 (M=H), que demuestra el peso molecular esperado.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

*Síntesis y plegamiento de Cys10, 11, 34, 50 (S-t-Bu)-hu-TARC (quimiocina regulada por timo y activación)*

El derivado de quimiocina de 71 residuos de aminoácidos se ensambla en un sintetizador peptídico 433 A (Perkin Elmer/ABI) que utiliza química de Fmoc/t-Bu y una resina basada en poliestireno funcionalizada con el enlazador ácido lábil ácido hidroximetilfenoxiacético (resina de Wang) en la cual Fmoc-Ser (t-Bu) se une mediante una esterificación catalizada por DMAP (4-dimetilaminopiridina). El grado de sustitución fue de 0.57 mmoles/g. La síntesis se condujo a una escala de 0.27 mmoles que utiliza un exceso de cinco veces de Fmoc-aminoácidos y reactivos activadores de DCI (N,N'-diisopropilcarbodiimida)/HOBt (1-hidroxibenzotriazol) en DMF. El tiempo de acoplamiento fue de aproximadamente 60 minutos con un monitoreo espectrofotométrico de desprotección de Fmoc.

Los cuatro tioles de cisteína se protegen con grupos S-t-Butilo y se utiliza un esquema de protección máximo para todas las otras cadenas laterales: Ser (t-Bu), Thr (t-Bu), Tyr (t-Bu), Asp (O-t-bu), Glu (O-t-Bu), Lys (Boc), Tro (Boc), Asn (Trt), Gln (Trt) y Arg (Pmc). Después de cada acoplamiento, se lleva a cabo el encasquetamiento con anhídrido acético y DIEA en DMF.

El polipéptido-resina resultante se trata a temperatura ambiente con una mezcla preparada recientemente de TFA/agua/TIS (triisopropilsilano)/fenol (78:5:12:5), v/v/v/p, 10 ml/g de resina) por 2.5-3.0 h. El derivado polipeptídico escindido se precipita mediante filtración directa de la mezcla escindida en éter de metil-t-butilo frío (MTBE) y el precipitado se separa mediante centrifugación, se lava dos veces con éter y se seca en aire.

El producto sin purificar se disuelve luego en ácido acético diluido, se liofiliza, redisuelve en ácido acético al 50% y se aplica a una columna de Sephadex G-50 (70x25 cm) que utiliza ácido acético al 50% como la fase móvil. Las fracciones colectadas se analizan mediante espectrometría de masa MALDI-TOF y aquellas que contienen el derivado polipeptídico deseado (PM 8,436.9 Da) se agrupan y liofilizan después de su dilución con agua.

Las fracciones agrupadas se disuelven de nuevo en ácido acético al 50% y se purifican adicionalmente mediante la carga en una columna C4 Vydac semipreparativa de 250 x 10 mm. Las muestras se eluyen a una velocidad de flujo de 3 ml/min con un gradiente lineal de 20-80% de B en 60 minutos, mientras que B fue TFA al 0.1% en acetonitrilo

## ES 2 261 509 T4

y A fue TFA al 0.1% en agua. La detección se hace a 280 nm y solamente las fracciones que contienen el polipéptido blanco se agrupan y se liofilizan antes del plegamiento.

El plegamiento del derivado de quimiocina purificado mediante RP-HPLC se lleva a cabo mediante la disolución inicial de 10 mg del producto en 1 mg de GnHCl 6M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M y Tris 10M a pH = 8.0 a temperatura ambiente. Después de 20 minutos, la solución se diluye mediante la adición de 10 ml de agua a la concentración final de GnHCl 0.6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, Tris 1 mM, pH = 7.2 y de una concentración del péptido de 1 mg/ml. El plegamiento se inicia mediante la adición de cisteína a una concentración de aproximadamente 20 mM (aproximadamente un exceso molar de 100 veces con respecto a la concentración del péptido) y gradualmente al incrementar la temperatura a 37°C.

La reacción para plegamiento, que ocurre a la temperatura constante de 37°C en aire, se monitorea mediante análisis de RP-HPLC de alícuotas de 25 microlitros de solución eliminadora de ácido con ácido acético en un módulo de separación Waters 2690 equipado con un detector en serie de fotodiiodo Waters 996, al utilizar una columna analítica C4 de Vydac y un gradiente de acetonitrilo del 20-60% en TFA 0.1%/agua en 40 minutos con una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Se recolecta 1 microlitro de cada pico de HPLC (que corresponde a los intermediarios de plegamiento de la reacción del intercambio tiol - disulfuro), se mezcla con 1 microlitro de una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo 1:2/ TFA al 1% en agua, se seca bajo vacío y se analiza mediante espectrometría de masa MALDI-TOF, que utiliza un espectrómetro Voyager-DE (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) equipado con un láser de nitrógeno. 78% del polipéptido plegado se formó después de 24 h. El pico cuyo PM corresponde al del producto plegado se verifica adicionalmente mediante reacción con N-etilmaleimida (NEM) para detectar la presencia de grupos tiol líderes (+125 Da para cada SH).

La actividad biológica de hu-TARC obtenida por la metodología de la presente invención se lleva a cabo de conformidad con el método de Imai (T. Imai *et al.*, J. Biol. Chem., 271, 21514, 1996).

Las líneas de células T de humano, Hut78, Hut102, y Jurkat, así como monocitos, neutrófilos y linfocitos recién extraídos se evaluaron por su migración a través de un filtro de policarbonato en respuesta a TARC. No se produjo ninguna respuesta quimiotáctica en monocitos o neutrófilos, ni por TARC preparada mediante síntesis química ni por TARC recombinante. En las líneas de células T Hut78 y Hut102, la TARC sintética así como la TARC recombinante induce migración con una curva típica en forma de campana con un efecto máximo a 100 ng/ml.

### Ejemplo 2

#### *Síntesis y plegamiento de Cys10, 34, 50 (S-t-Bu)-hu-TARC y Cys11, 34, 50 (S-t-Bu)-hu-TARC*

La síntesis, purificación y plegamiento de Cys10, 34, 50 (S-t-Bu) hu-TARC y derivados de Cys11, 34, 50 (S-t-Bu)-hu-TARC ha sido conducida en las mismas condiciones adoptadas para Cys10, 11, 34, 50 (S-t-Bu) hu-TARC (ejemplo 1), la única diferencia es la protección Trt en Cys10 y Cys11, respectivamente, la cual se remueve de manera concomitante para escindir los precursores polipeptídicos a partir de la resina. Los rendimientos de las quimiocinas finales plegadas fueron del 80% y del 79%, respectivamente.

### Ejemplo 3

#### *Síntesis y plegamiento de Cys34, 50 (S-Bu)-hu-TARC*

La síntesis, purificación y plegamiento del derivado de Cys34, 50 (S-Bu) hu-TARC se condujo en las mismas condiciones de los derivados de los ejemplos 1 y 2, excepto que ambas Cys10 y Cys11 estuvieron protegidas por Trt, el cual se remueve durante la escisión final de la resina por TFA. El rendimiento del producto plegado fue de aproximadamente 75%.

### Ejemplo 4

#### *Síntesis y plegamiento de Cys10, 11, 26, 34, 50, 68 (S-t-Bu)-hu-I-309*

La síntesis de hu-I-309 que contiene 6 cisteínas protegidas (S-t-Bu) se conduce a una escala de 0.12 mmoles en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 que utiliza una resina de Wang Fmoc-Lys(Boc) (grado de sustitución de 0.61 mmoles/g). El polipéptido-resina resultante se trata como se describe en el ejemplo 1 y el material purificado por G50 se purifica adicionalmente mediante carga en una columna C18 de Vydac de 250 x 10 mm (como se muestra en la figura 1 y 2).

El plegamiento del derivado de quimiocina purificado por RP-HPLC se lleva a cabo mediante la disolución de 65 mg del producto en 60 ml de GuHCl 0.6 M, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM y Tris 1 mM a pH 8.0 y al añadir cisteína a una concentración de 100 veces un exceso molar con respecto al péptido. La solución del polipéptido se deja a 37°C por 4 días. Después de la acidulación con TFA el material plegado se aísla mediante RP-HPLC al utilizar una columna C18 de Vydac de 250 x 10 mm (como se muestra en la figura 3 y 4). La formación completa de pares de cisteína se verifica mediante espectrometría de masas después de reacción con N-etilmaleimida (NEM). No se observa ningún incremento en el PM que indique ausencia de grupos tiol libres (como se muestra en la figura 5). El rendimiento de la quimiocina plegada final fue de casi el 25%. La hu-I-309 sintética, plegada muestra una actividad biológica equivalente a la proteína recombinante (figura 6).

## ES 2 261 509 T4

La cromatografía analítica se lleva a cabo al utilizar las siguientes condiciones:

Columna: C18 250 x 4.6 mm (Vydac# 238TP54)

5 Fase móvil: A = H<sub>2</sub>O al 100% TFA al 0.1%

B = CH<sub>3</sub>CN al 100% TFA al 0.1%

Gradiente: la composición % de B se reporta en el cromatograma

10

Detector: 214 nm.

### Ejemplo 5

15 *Síntesis y plegamiento del fragmento C-terminal de Plasmodium vivax*

La síntesis y purificación de la proteína 303-372 del circumsporozoito *Plasmodium vivax* (PvCS) que contiene 4 cisteínas protegidas (S-t-Bu) se conduce en las mismas condiciones como en el ejemplo 1.

20 El plegamiento se lleva a cabo mediante la adición de 27 mg del péptido en 2.7 ml de GuHCl 6 M en regulador de pH Tris 0.1 M, pH 8.5. La solución se mezcla por 10 minutos. Luego se añaden 13.5 ml de EDTA 1 mM, NaCl 0.2 M regulado en su pH a pH 8.8 en regulador de pH de Tris 0.2 M. Finalmente, se añaden 10.8 ml de cisteína 35 mM en EDTA 1 mM, NaCl 0.2 M regulado en su pH a pH 8.8 en regulador de pH de Tris 0.2 M. La mezcla de reacción se lleva a 37°C. La reacción de plegamiento se sigue en un HPLC de fase reversa hasta su término (3-6 h) (figura 7A) y la reacción se detiene mediante enfriamiento por 5 minutos a 4°C seguido por adición de TFA al 10% a 4°C para alcanzar una concentración final de TFA al 1% (3 ml de TFA al 10%). El producto se purifica subsecuentemente mediante HPLC en fase reversa (figura 8) y se determina la masa del producto final (figura 9). El rendimiento del producto oxidado final fue del 70-80%.

30 La cromatografía analítica se lleva a cabo al utilizar las siguientes condiciones:

Columna: C4 250 x 4.6 mm (Vydac# 214TP54)

Fase móvil: A = H<sub>2</sub>O al 100% TFA al 0.1%

35

B = CH<sub>3</sub>CN al 100% TFA al 0.1%

Gradiente: la composición % de B se reporta en el cromatograma

40

Detector: 214 nm.

### Ejemplo 6

*Síntesis a gran escala y plegamiento del fragmento C-terminal de Plasmodium falciparum*

45

Una síntesis y purificación a gran escala de la proteína del circumsporozoito *Plasmodium falciparum* (PfCS 282-383) que contiene solamente 2 de 4 cisteínas protegidas (S-t-Bu) se conduce en las mismas condiciones como en el ejemplo 1 (como se muestra en las figuras 10 y 11) excepto por lo siguiente.

50 El plegamiento se lleva a cabo mediante la disolución de 1.1 g del péptido parcialmente purificado en 1.0 L de CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 0.1 M, pH 8.0, sin adición de cisteína libre al regulador de pH para plegamiento. La mezcla de reacción se mantiene a 32°C durante 18 h. El producto se purifica luego mediante HPLC en fase reversa (figura 12 y 13). El rendimiento del producto oxidado final fue de casi el 37%.

55 La cromatografía analítica se lleva a cabo al utilizar las siguientes condiciones:

Columna: C18 250 x 4.6 mm (Vydac# 238TP54)

Fase móvil: A = H<sub>2</sub>O al 100% TFA al 0.1%

60

B = CH<sub>3</sub>CN al 100% TFA al 0.1%

Gradiente: la composición % de B se reporta en el cromatograma

65

Detector: 214 nm.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para plegar polipéptidos sintetizados químicamente, que comprende tratar a un polipéptido y/o proteína que comprende dos o más residuos de S-t-butil-tio-cisteína con un agente reductor en un regulador para plegamiento que tiene un pH comprendido entre 7 y 9 y una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C.
- 10 2. Un procedimiento para la preparación de proteínas activas biológicamente, que comprende
- (a) sintetizar químicamente un polipéptido que comprende dos o más residuos de S-t-butil-tio-cisteína;
- (b) tratar a este polipéptido con un agente reductor en un regulador para plegamiento que tiene un pH comprendido entre 7 y 9 y una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C; y
- 15 (c) purificar los polipéptidos y/o proteínas plegadas obtenidas.
3. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, donde el agente reductor es cisteína.
- 20 4. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 ó 2 donde el agente reductor es un agente reductor intramolecular formado por cisteínas libres en las cadenas de polipéptidos que son generadas desde la cisteína protegida con grupos de ácido labil en posiciones seleccionadas de la cadena de polipéptidos que se escinde de la cadena de polipéptido a partir de la resina de pH ácido.
- 25 5. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1-4, donde el regulador para plegamiento comprende una o más sales caotrópicas.
6. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 5, donde las sales caotrópicas se eligen a partir del grupo que consiste en cloruro de guanidinio y urea.
- 30 7. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 4 - 6, donde las sales caotrópicas en el regulador para plegamiento están presentes en una concentración de 0.1- 1 M.
8. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 - 7, donde el pH se encuentra comprendido entre 7 y 8.5.
- 35 9. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 - 8, donde la temperatura se encuentra comprendida entre 27° y 38°C.
- 40 10. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 9, donde la temperatura es de aproximadamente 37°C.
11. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 2, que comprende los pasos de
- (a) ensamblar un polipéptido S-t-butil-tio cisteína sobre un soporte polimérico insoluble mediante elongación de cadena paso a paso;
- 45 (b) escindir la cadena polipeptídica de S-t-butil-tio cisteína a partir del soporte mediante acidolisis;
- (c) purificar el polipéptido S-t-butil-tio cisteína obtenido;
- 50 (d) plegar el polipéptido S-t-butil-tio cisteína purificado mediante el tratamiento de estos derivados de polipéptido con un exceso molar de cisteína en un regulador de pH para plegamiento que comprende una sal caotrópica y que tiene un pH alcalino y una temperatura de aproximadamente 37°C; y
- 55 (e) purificar las proteínas plegadas obtenidas mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
12. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 11, donde la sal caotrópica es cloruro de guanidinio.
- 60 13. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 11 o 12, donde el soporte polimérico es una resina basada en poliamida o poliestireno funcionalizada con el aglutinante de ácido lábil ácido hidroximetilfenoxiacético.

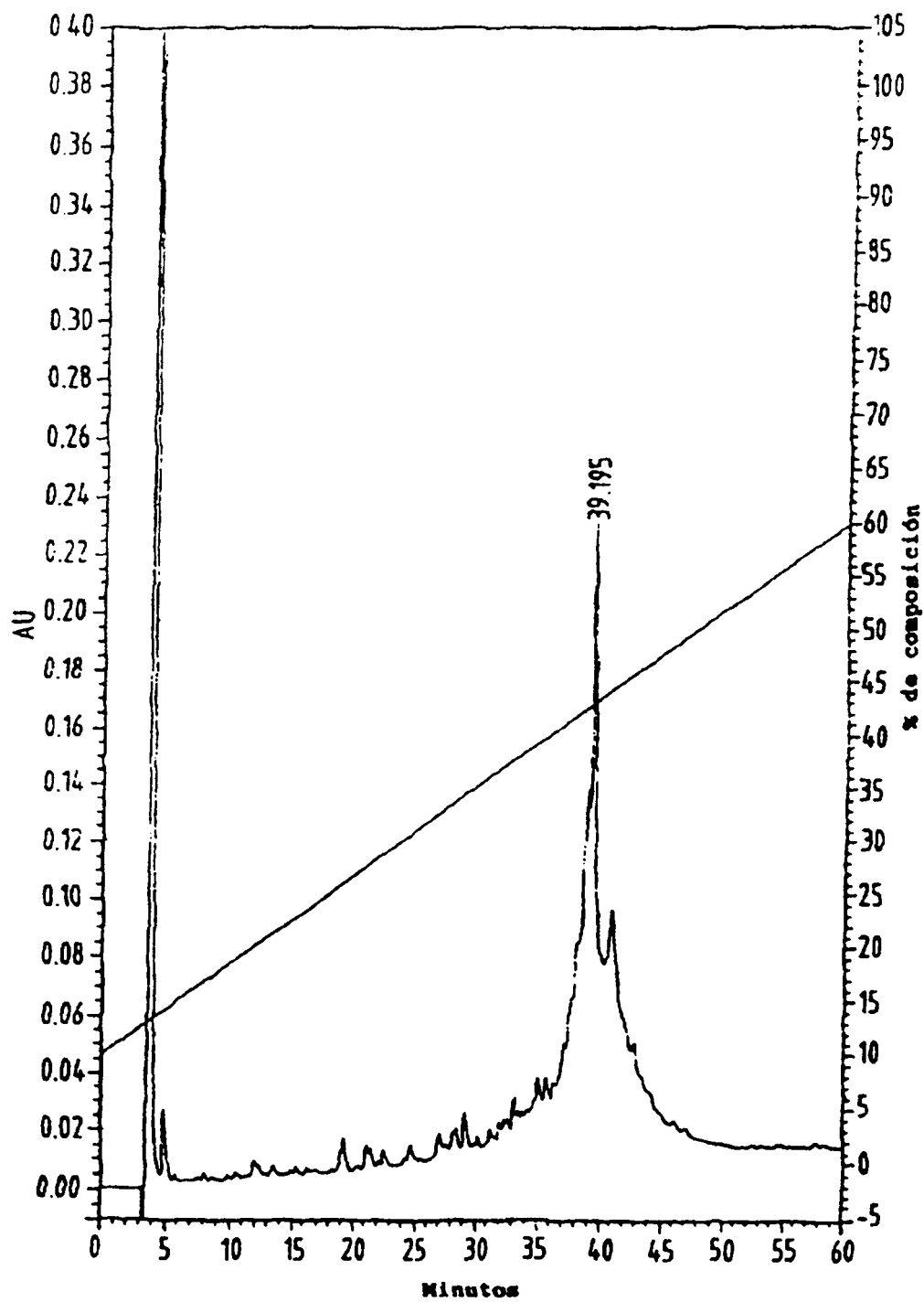


FIG. 1

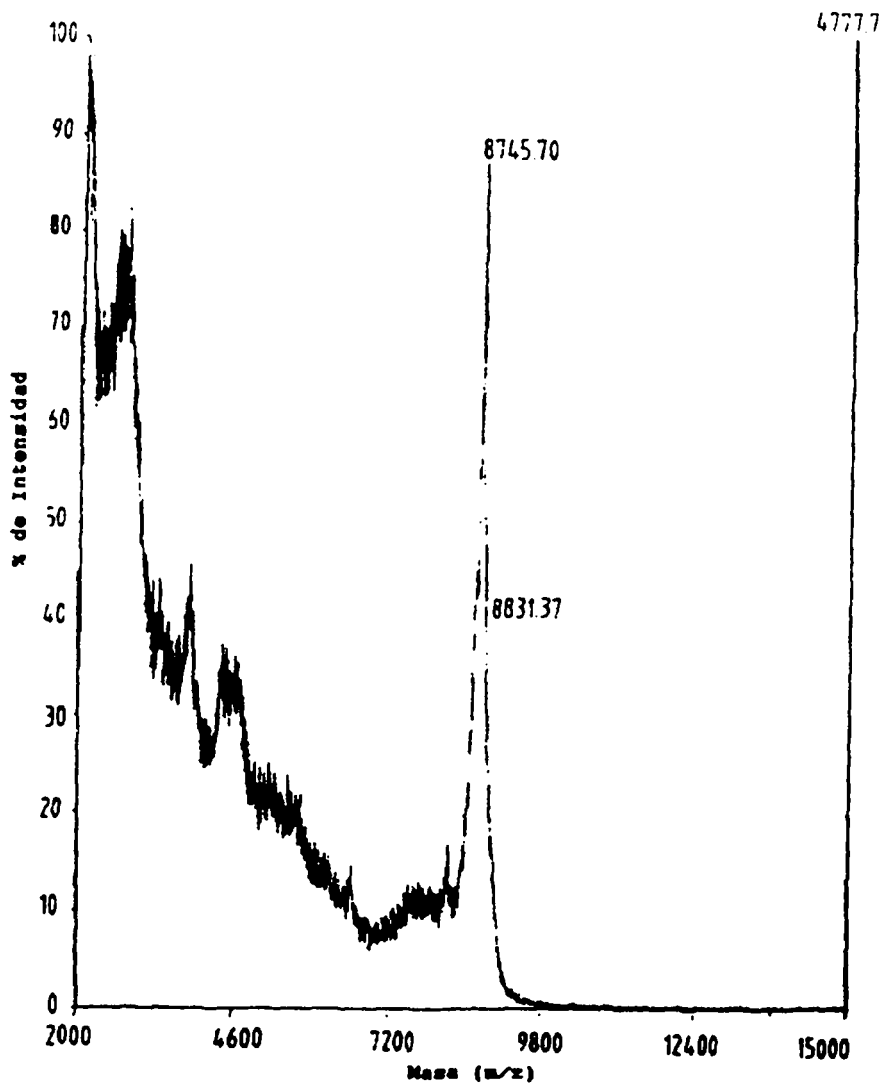


FIG. 2

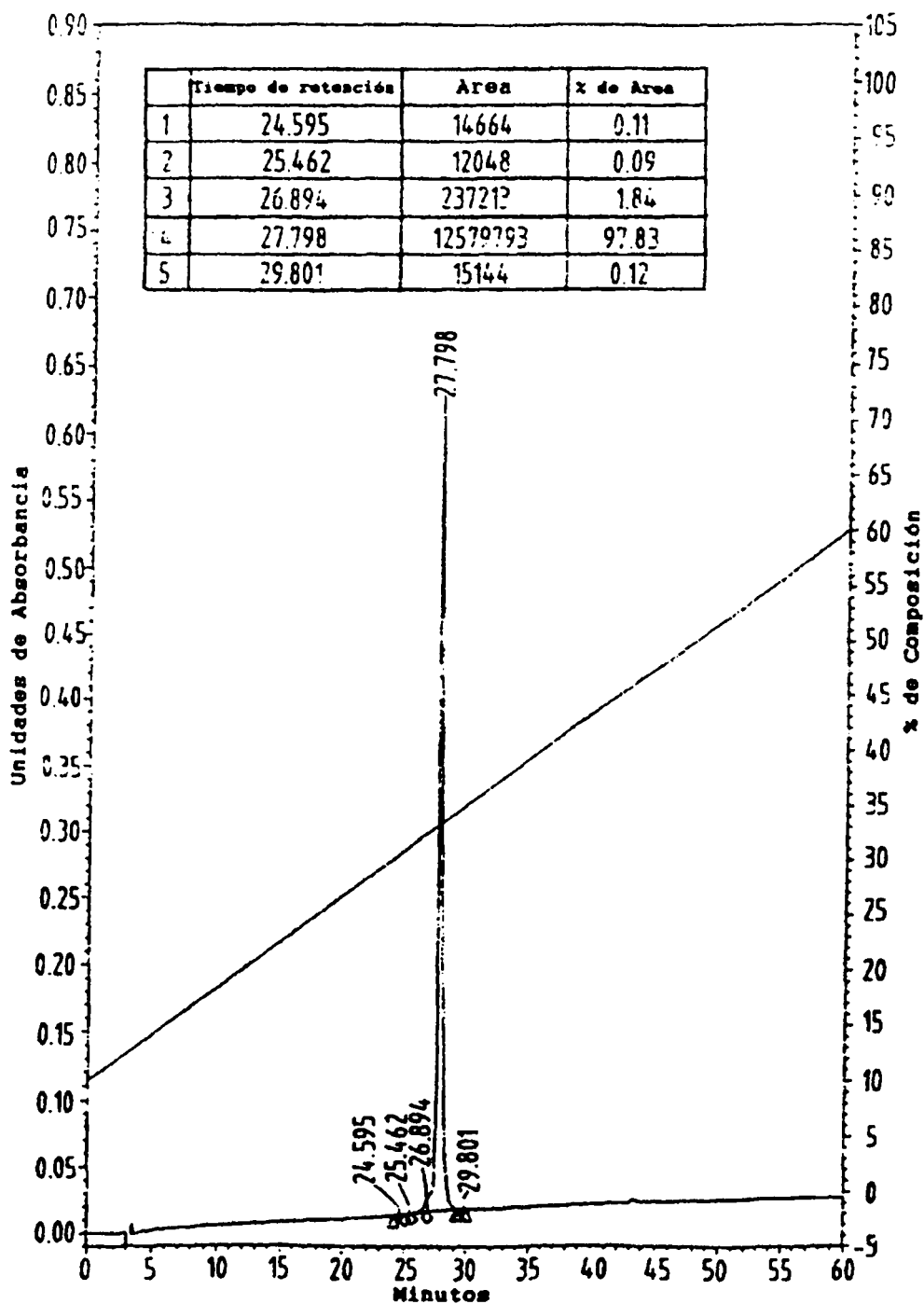


FIG. 3

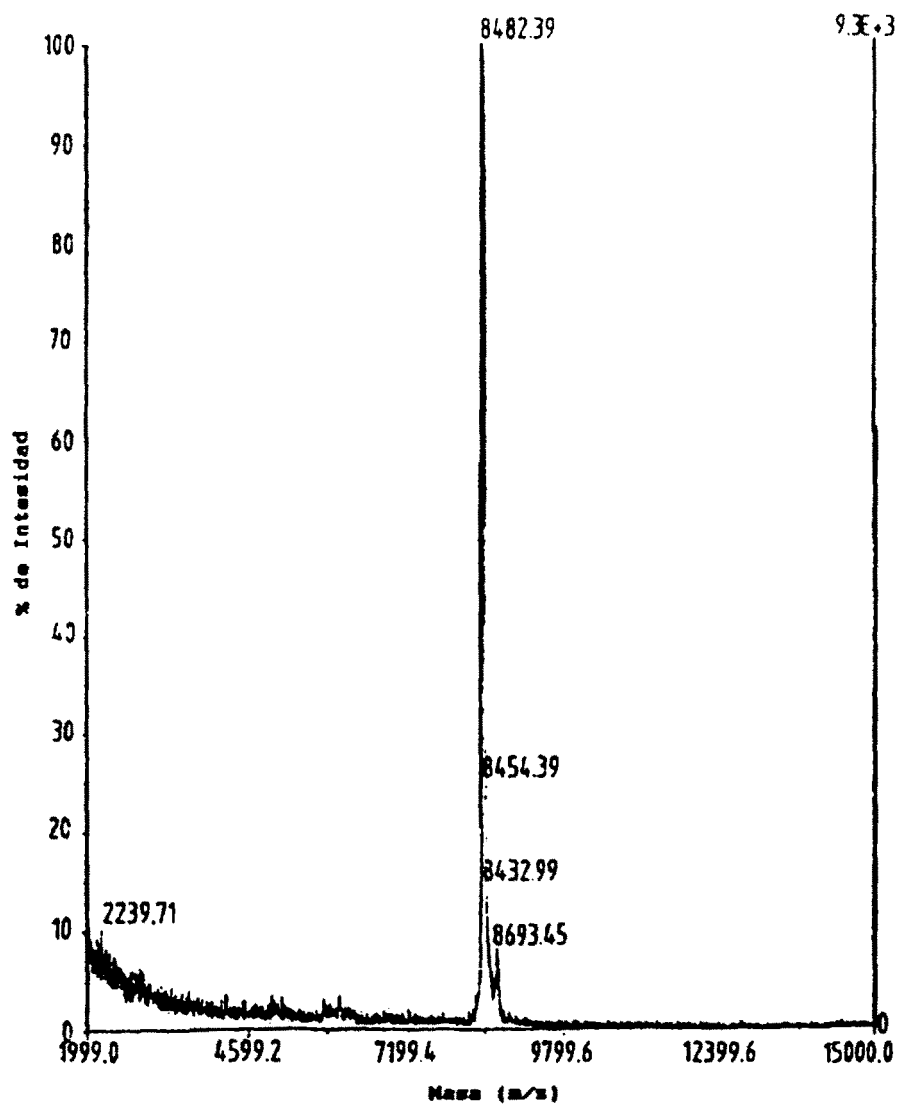


FIG. 4

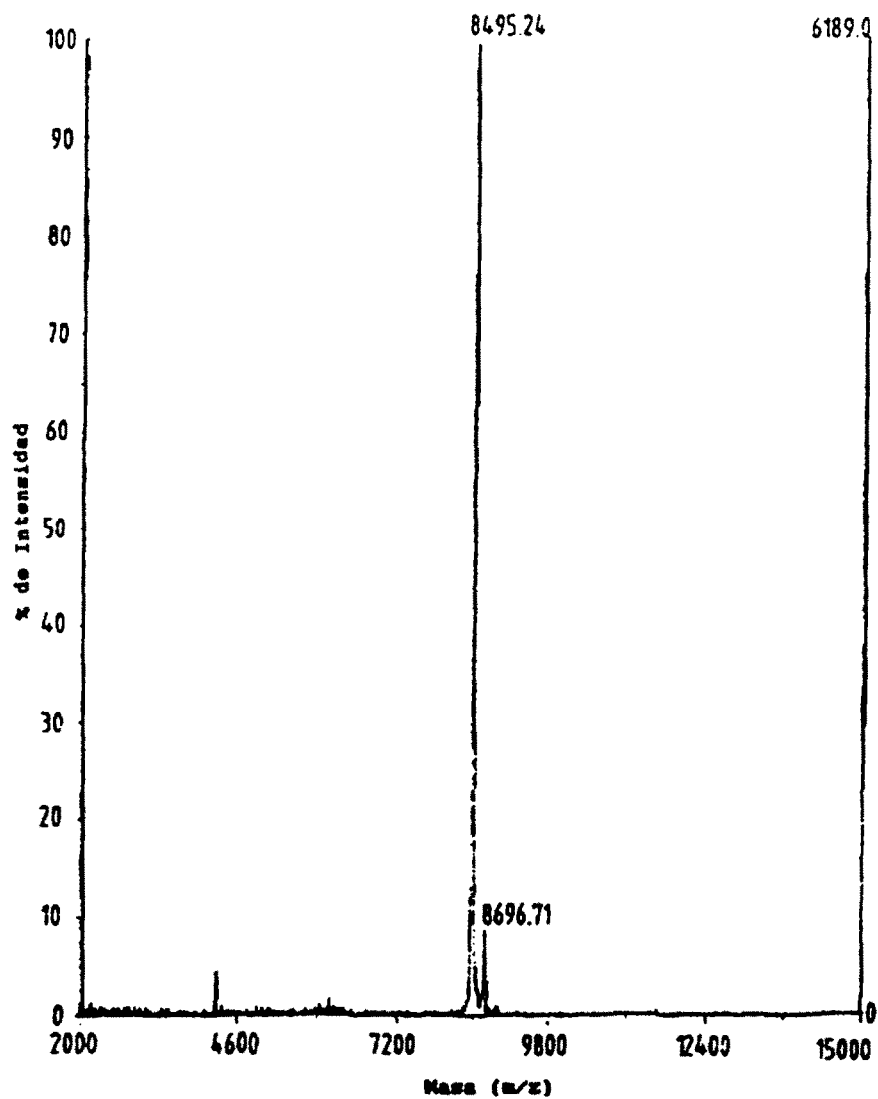


FIG. 5

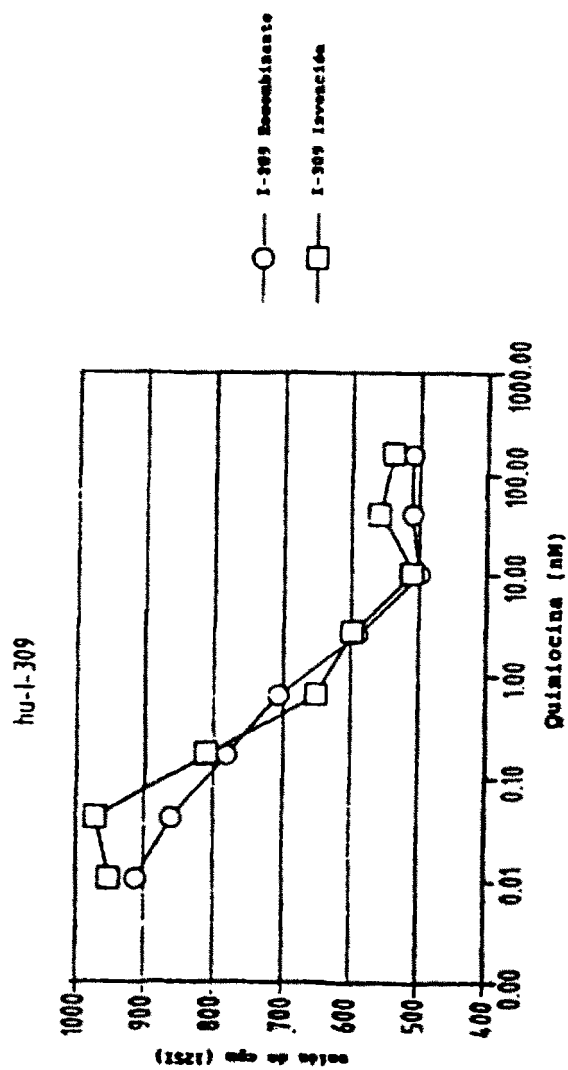


FIG. 6

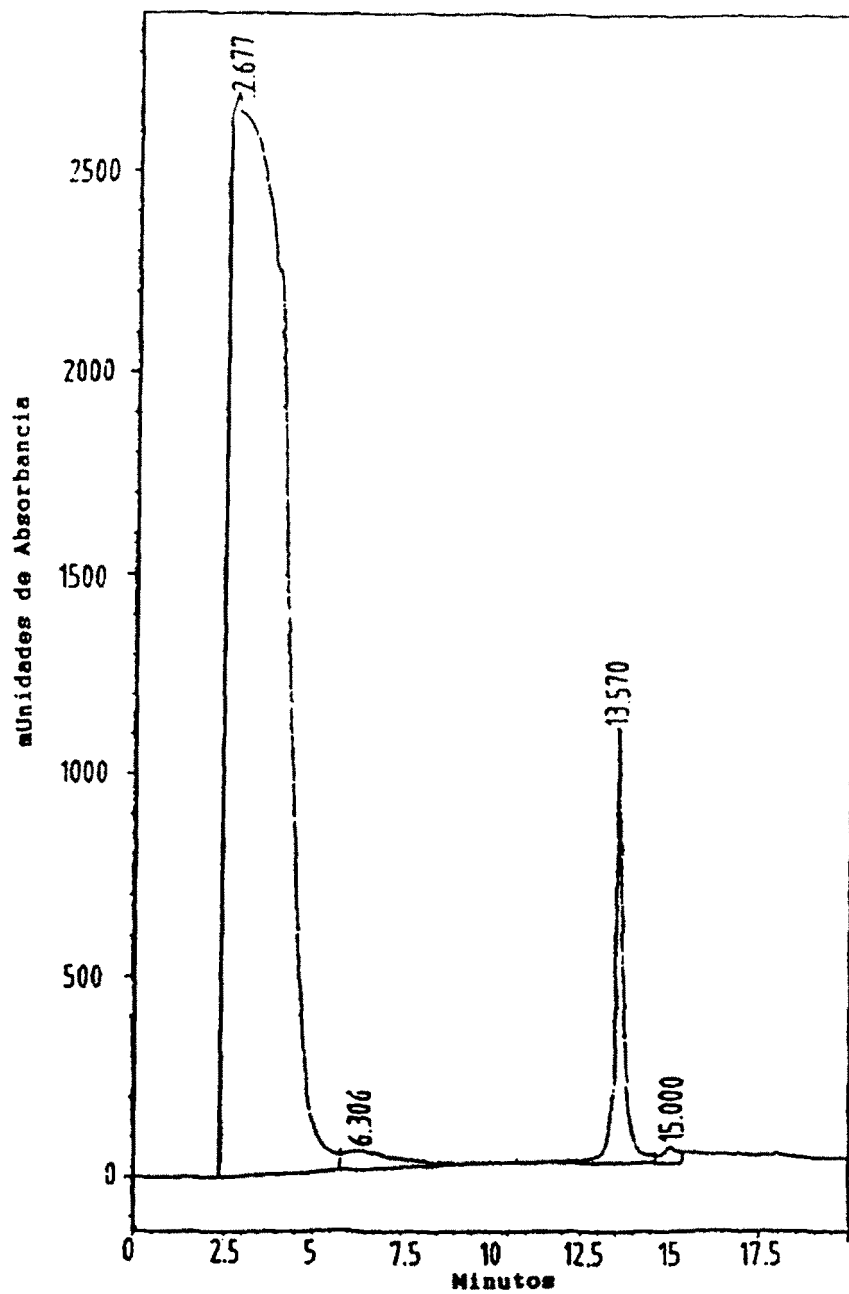


FIG. 7

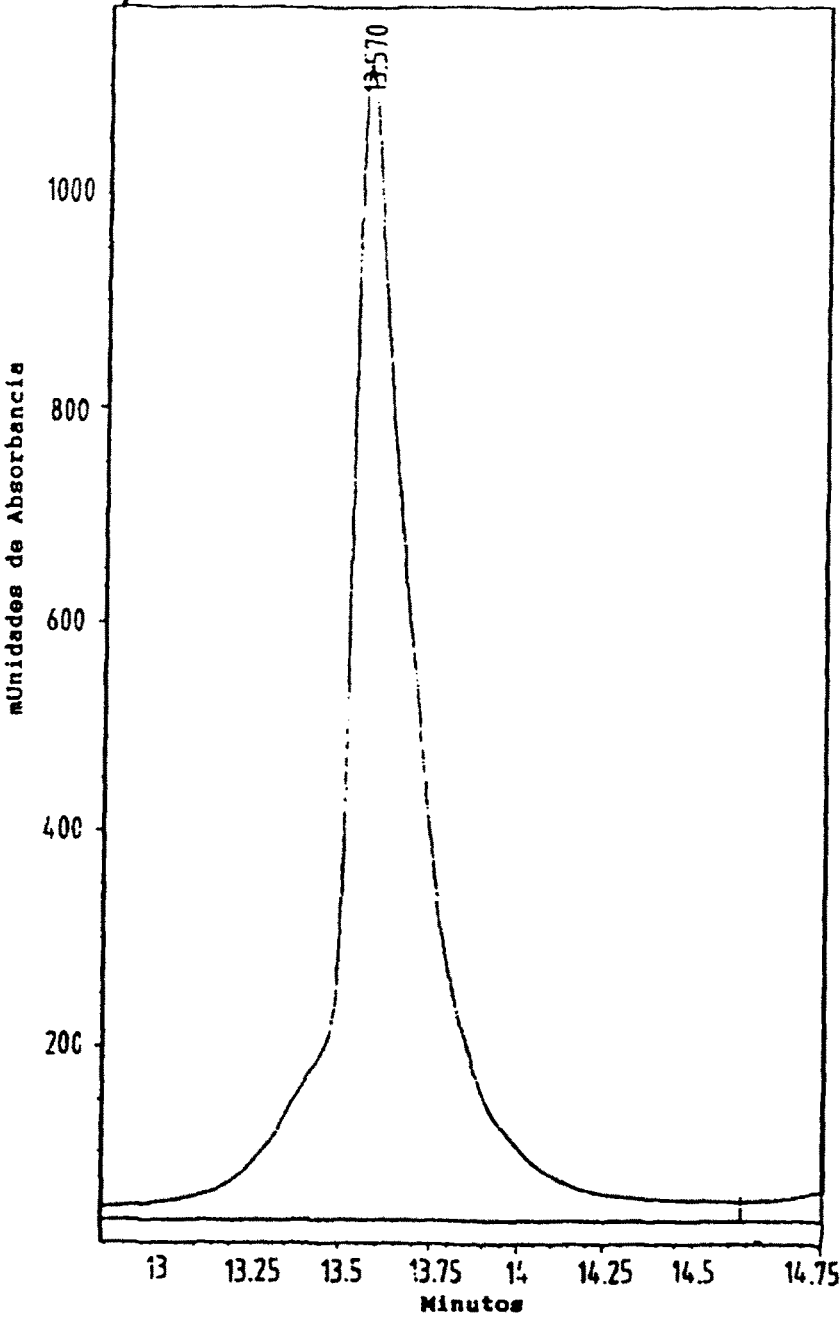


FIG. 8

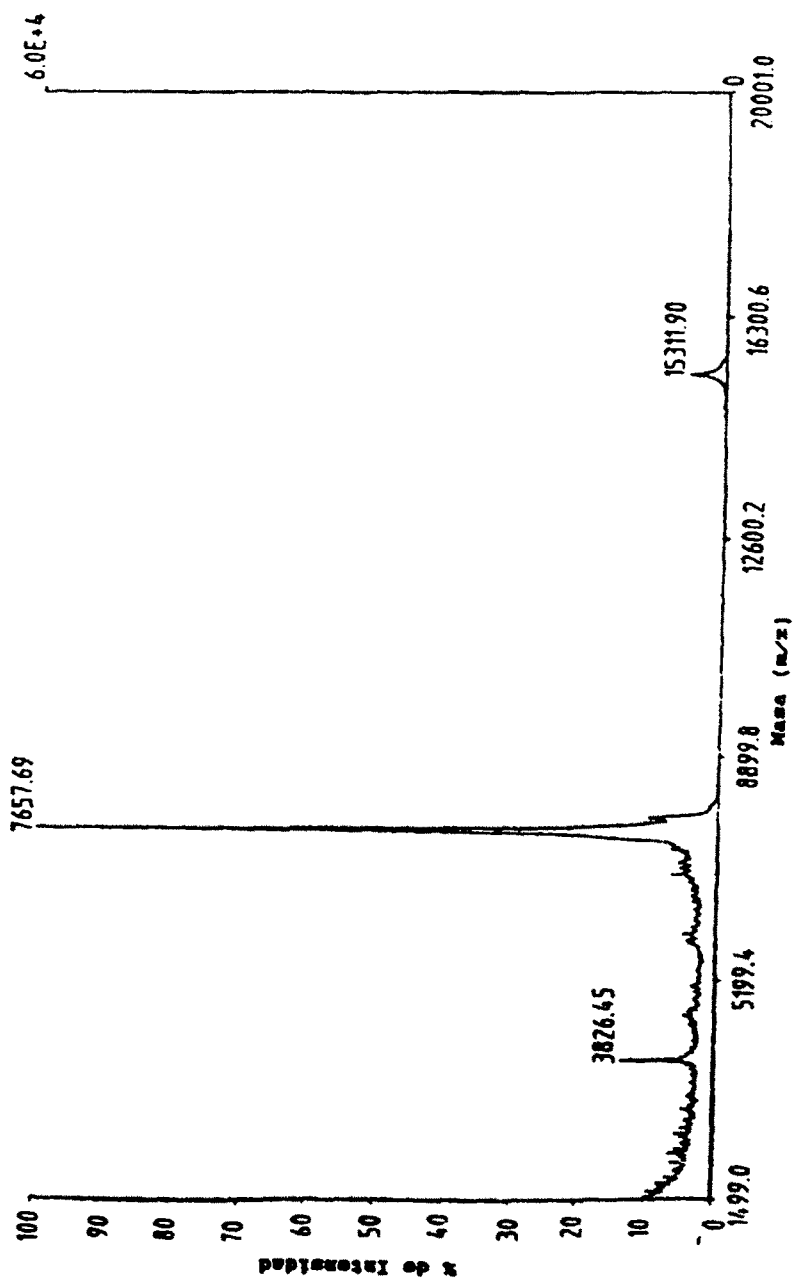


FIG. 9

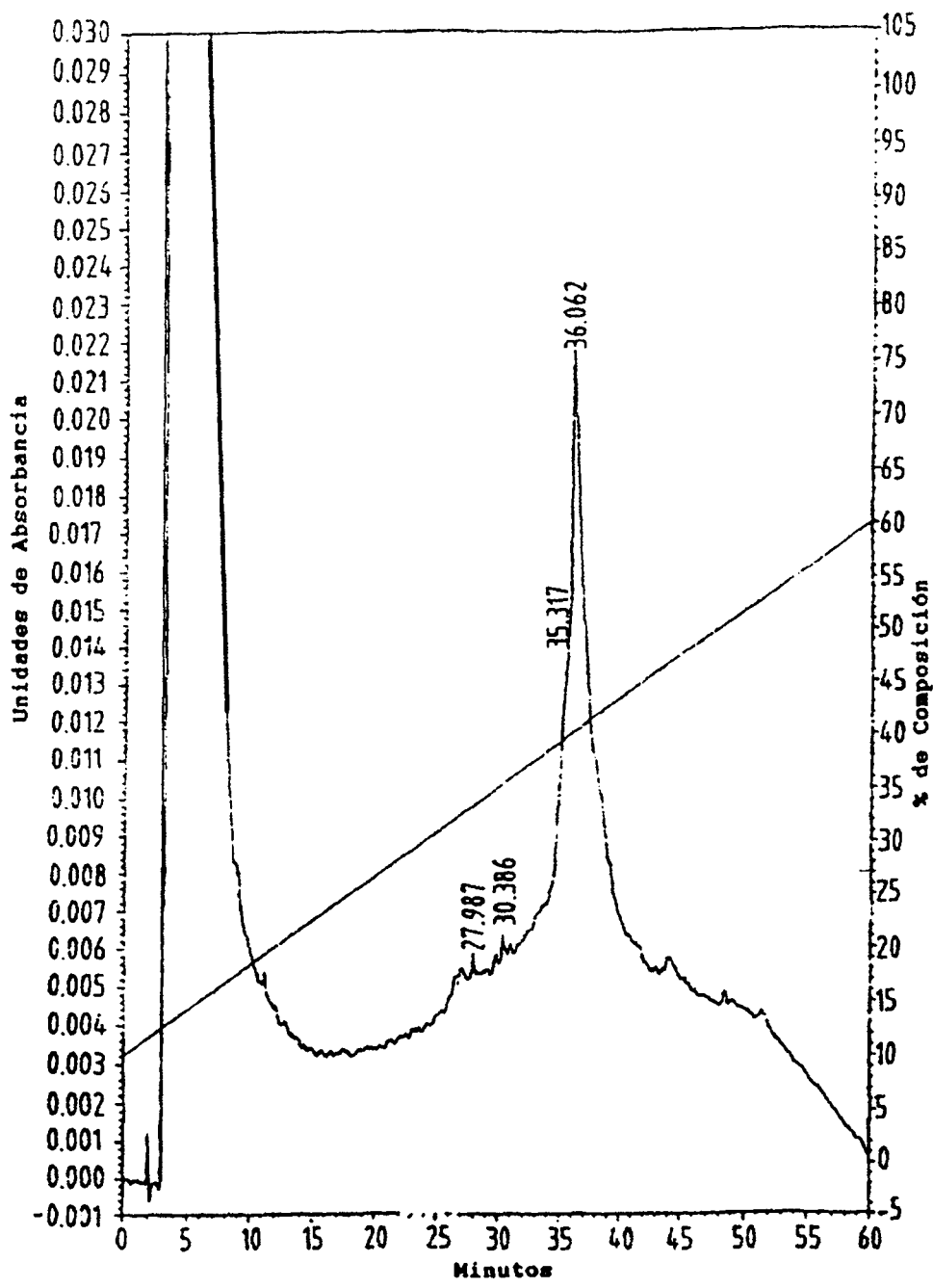


FIG. 10

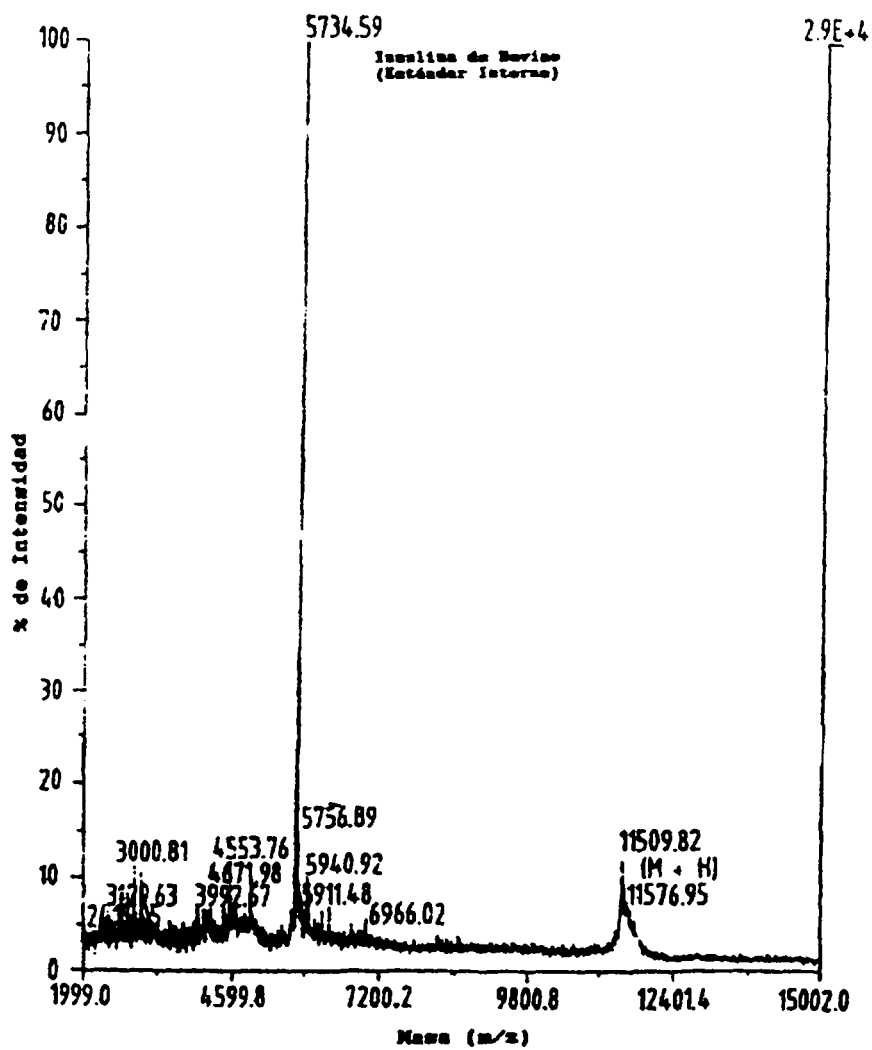


FIG. 11