



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 673**

51 Int. Cl.:
C07K 14/155 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03026521 .9**
86 Fecha de presentación : **18.11.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1422237**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Métodos para la producción de péptidos antifusogénicos recombinantes.**

30 Prioridad: **19.11.2002 EP 02025618**
17.01.2003 EP 03000988

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Kaczmarek, Alexandra;**
Kopetzki, Erhard;
Schantz, Christian y
Seeber, Stefan

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la producción de péptidos antifusogénicos recombinantes.

La invención está relacionada con métodos para la producción recombinante de péptidos que inhiben la fusión de virus con las membranas de células diana. En concreto, esta invención está relacionada con la producción recombinante de inhibidores peptídicos de lentivirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), el virus del sarampión, virus influenza como el virus respiratorio sincitial (VRS) o el virus parainfluenza humano (VPIH).

Antecedentes de la invención

La fusión de los virus con la membrana celular es un paso esencial para la entrada en la célula de virus envueltos entre los que están los siguientes: VIH-I, VIH-II, VRS, virus del sarampión, virus influenza, virus parainfluenza, virus de Epstein-Barr y virus de la hepatitis. Una vez ha entrado en la célula, ya puede iniciarse la cascada de replicación del virus dando lugar a una infección vírica.

El VIH es un miembro del género Lentivirus que incluye retrovirus con genomas complejos y que presentan nucleocápsides cónicas. Otros ejemplos de lentivirus incluyen el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), el virus Visna y el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE). Como todos los retrovirus, el genoma del VIH está codificado por RNA, que es transcrito por transcripción inversa a DNA vírico por la transcriptasa inversa (TI) vírica cuando entra en una nueva célula huésped. Los virus influenza y sus mecanismos de entrada en la célula están descritos en Bullough, P.A. *et al.*, Nature 371 (1994) 37-43; Carr, C.M. y Kim, P.S., Cell 73 (1993) 823-832 y Wilson, I.A. *et al.*, Nature 289 (1981) 366-373.

Todos los lentivirus están envueltos por una bicapa lipídica que proviene de la membrana de la célula huésped. Las glicoproteínas de superficie expuestas (SU, gp120) están ancladas al virus a través de interacciones con la proteína transmembrana (TM, gp41). La bicapa lipídica también contiene varias proteínas de membrana celular derivadas de la célula huésped, entre las que hay antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, actina y ubiquitina (Arthur, L.O. *et al.*, Science 258 (1992) 1935-1938). Un caparazón matricial formado por aproximadamente 2000 copias de la proteína de la matriz (MA, p17) recubre la superficie interna de la membrana vírica, y en el centro del virus se encuentra una nucleocápside cónica formada por unas 2000 copias de la proteína de la cápside (CA, p24). La nucleocápside encapsula dos copias del genoma vírico completo, que está estabilizado en forma de complejo de ribonucleoproteínas con unas 2000 copias de la proteína de la nucleocápside (NC, p7). Además contiene tres enzimas de codificación esencialmente vírica: proteasa (PR), transcriptasa inversa (TI) e integrasa (IN). Las partículas víricas también empaquetan las proteínas accesorias Nef, Vif y Vpr. Hay otras tres proteínas accesorias que actúan en la célula huésped, Rev, Tat y Vpu, que no parecen estar empaquetadas.

En el caso del VIH, la entrada del virus está asociada con las glicoproteínas de superficie de la envuelta del VIH (Lawless, M.K., *et al.*, Biochemistry 35 (1996) 13697-13708; y Turner, B.G. y Summers, M.F., J. Mol. Biol. 285 (1999) 1-32). En el caso del VIH-I, esta proteína de superficie se sintetiza como una única proteína precursora de 160 kD que es escindida por una proteasa celular en dos glicoproteínas: gp-41 y gp-120. La proteína gp-41 es una proteína transmembrana y gp-120 es una proteína extracelular que se mantiene asociada de forma no covalente con gp-41 en forma trimérica o multimérica (Hammarström, M.-L., *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 989 (1989) 269-280). El VIH se dirige a los linfocitos CD4+ porque la proteína de superficie CD4 actúa como el receptor celular para el virus VIH-I. La entrada del virus en las células depende de la unión de gp-120 con las moléculas receptoras celulares CD4+ mientras que gp-41 ancla el complejo glicoproteico de la envoltura en la membrana vírica e interviene en la fusión de membrana (McDougal, J.S., *et al.*, Science 231 (1986) 382-385; y Maddon, P.J., *et al.*, Cell 47 (1986) 333-348).

La proteína gp41 es la subunidad transmembrana que permite la fusión de las membranas vírica y celular. El núcleo del ectodominio de gp41 es un conjunto de seis hélices formado por tres horquillas helicoidales, cada una de ellas formada por una hélice N emparejada con una hélice C antiparalela (Chan, D.C., *et al.*, Cell 89 (1997) 263-273; Weissenhorn, W., *et al.*, Nature 387 (1997) 426-430; Tan, K., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 12303-12308). Las hélices N forman una hélice superenrollada trimérica interior con tres surcos hidrófilos conservados y una hélice C llenando cada uno de los surcos. Esta estructura probablemente corresponde a la parte central del estado de gp41 activo en la fusión. Según Chan, D.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 15613-15617, existen pruebas de que una cavidad destacada de la hélice superenrollada de la gp41 del VIH de tipo 1 es una diana farmacológica atractiva.

Se asume que los mecanismos mediante los cuales gp41 facilita la fusión de membranas pueden implicar la formación de un trímero de hélices superenrolladas del que se piensa que dirige la transición de los estados en reposo a los fusogénicos, como está descrito, por ejemplo, en el caso de la hemaglutinina del virus influenza (Wilson, I.A., *et al.*, Nature 289 (1981) 366-373; Carr, C.M. y Kim, P.S., Cell 73 (1993) 823-832; Bullough, P.A., *et al.*, Nature 371 (1994) 37-43).

Los péptidos C (péptidos correspondientes a la hélice C) de virus envueltos, como DP178 y C34, inhiben de forma potente la fusión de membranas tanto para cepas adaptadas al laboratorio como para aislados primarios de VIH-I (Malashkevich, V.N., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 9134-9139; Wild, C.T., *et al.*, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 91 (1994) 9770-9774). Un ensayo clínico de fase I con el péptido C DP178 sugiere que posee una actividad antiviral *in vivo*, dando lugar a cargas virales reducidas (Kilby, J.M., *et al.*, Nature Medicine 4 (1998) 1302-1307). Las características estructurales del núcleo de gp41 sugieren que estos péptidos actúan a través de un mecanismo de dominancia negativa en el que los péptidos C se unen a la hélice superenrollada central de gp41 provocando su inactivación (Chan, D.C., *et al.*, Cell 93 (1998) 681-684).

En cada interfase de las hélices superenrolladas se encuentra una cavidad profunda, formada por un conjunto de residuos de la hélice superenrollada de tipo N, que se ha propuesto como una diana atractiva para el desarrollo de compuestos antivirales. Tres residuos de la hélice C (Trp-628, Trp-631 e Ile-635) se insertan en esta cavidad y establecen abundantes interacciones hidrófobas. El análisis mutacional indica que dos de los residuos de la hélice N (Leu-568 y Trp-571) que forman esta cavidad son claves para la actividad de fusión de membranas (Cao, J., *et al.*, J. Virol. 67 (1993) 2747-2755). Por lo tanto, los compuestos que se unen con elevada afinidad a esta cavidad y evitan el apareamiento normal entre hélices C y N pueden ser inhibidores efectivos del VIH-1. Los residuos de la cavidad están muy conservados entre diversos aislados de VIH-1. Asimismo, un péptido C que contenga la región de unión a la cavidad es menos susceptible a la evolución de los virus resistentes que DP178, al que le falta esta región (Rimsky, L.T., *et al.*, J. Virol. 72 (1998) 986-993). Estas observaciones sugieren que los ligandos de elevada afinidad dirigidos frente a la superficie de la hélice superenrollada muy conservada, especialmente su cavidad, presentarán una amplia actividad frente a diversos aislados de VIH y tienen una menor probabilidad de ser esquivados por mutantes resistentes al fármaco.

La estructura fusogénica de las proteínas de fusión de la envoltura se vio de los siguientes virus: influenza, de la leucemia murina Moloney y de la inmunodeficiencia en simios [*cit. in* Chan, D.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 15613-15617], el respiratorio sincitial humano, el Ébola, el de la leucemia de linfocitos T en humanos y el parainfluenza en simios. Esta estructura indica que existe una estrecha relación entre las familias orthomyxoviridae, paramyxoviridae, retroviridae, y otras como filoviridae, en las que la entrada vírica dentro de las células diana se ve facilitada por glicoproteínas de tipo transmembrana como gp41 del VIH-1, la hemaglutinina del virus influenza, GP2 del Ébola, entre otras (Zhao, X. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 14172-14177).

En la más reciente literatura científica se describen métodos para la preparación de inhibidores peptídicos (péptidos C) (véase, p. ej., Root, M.J., *et al.*, Science 291 (2001) 884-888); Root *et al.* describen el péptido C37-H6 que proviene del VIH-1 HXB2 y contiene los residuos 625 a 661. Se expresó de forma recombinante como un segmento N40 con un conector GGR y una cola de histidinas, se expresó en *E. coli* y se purificó de la fracción soluble de lisados bacterianos. Zhao, X., *et al.* describen en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 14172-14177 un gen sintético de recRSV-1 (virus respiratorio sincitial humano) que codifica los residuos 153-209, un conector rico en G, los residuos 476-524, el sitio de escisión del Factor Xa y una cola de histidinas. Chen, C.H., *et al.*, describen en J. Virol. 69 (1995) 3771-3777 la expresión recombinante del dominio extracelular de gp41 sintetizado como una proteína de fusión formada por los residuos 540-686 fusionados a MBP.

Se conocen una serie de inhibidores peptídicos, también designados como péptidos antifusogénicos, de estos sucesos asociados con la fusión de membranas. Un ejemplo es la inhibición de la transmisión retroviral a células no infectadas. Estos péptidos están descritos, por ejemplo, en Lambert, D.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 2186-2191; en las patentes estadounidenses núms. US 6 013 263, US 6 017 536 y US 6 020 459; y en WO 00/69902, WO 99/59615 y WO 96/40191. Otros péptidos que inhiben sucesos asociados con la fusión están descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núms. US 6 093 794, US 6 060 065, US 6 020 459, US 6 017 536, US 6 013 263, US 5 464 933, US 5 656 480 y en WO 96/19495.

Ejemplos de péptidos lineales derivados del ectodominio de gp-41 del VIH-1 que inhiben la fusión vírica son DP-107 y DP-178. DP-107 es una porción de gp-41 cercana al péptido de fusión aminoterminal de la que se ha demostrado que tiene una estructura en hélice y que oligomeriza fuertemente en un modo coherente con la formación de hélices superenrolladas (Gallagher, W.R., *et al.*, Aids Res. Hum. Retrovirus 5 (1989) 431-440, Weissenhorn, W., *et al.*, Nature 387 (1997) 426-430). DP-178 es una forma derivada de la región carboxiterminal del ectodominio de gp-41 (Weissenhorn, W., *et al.*, Nature 387 (1997) 426-430). Aunque en solución no se puede discernir su estructura, este péptido y análogos restringidos del mismo adoptan una estructura en hélice, se unen a un surco del trómero de la hélice superenrollada aminoterminal de gp-41 y así evita la transformación de gp-41 al estado fusogénico (Judice, J. K., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 13426-13430).

Este tipo de péptidos de cadena corta normalmente se preparan mediante síntesis química. La síntesis química se describe, por ejemplo, en Mergler, M., *et al.*, Tetrahedron Letters 29 (1988) 4005-4008 y 4009-4012; Andersson, L., *et al.*, Biopolymers 55 (2000) 227-250; y en Jones, J.H., J. Pept. Sci. 6 (2000) 201-207. En WO 99/48513 se describen otros métodos.

Sin embargo, la síntesis química de péptidos presenta varios inconvenientes. El más importante es la racemización, que da lugar a una pureza óptica insuficiente. En la química de los péptidos, la racemización también implica la epimerización en uno de varios centros quirales. Si en un único paso de acoplamiento solo se produce un 1% de racemización, en 100 pasos de acoplamiento solamente se recibirá un 61% del péptido diana (Jakubke, H.D., Peptide, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996), p. 198). Es obvio que la cantidad de impurezas aumenta cuanto mayor es la longitud de la cadena y su eliminación es cada vez más difícil y costosa.

La síntesis química a gran escala está limitada a causa de su elevado coste y por la falta de disponibilidad de derivados de aminoácidos protegidos como materiales de inicio. Por un lado, estos materiales iniciales deben emplearse en exceso para que las reacciones puedan ser completas; por otro, su uso debe ser equilibrado por razones de coste, seguridad y aspectos medioambientales (Andersson *et al.*, Biopolymers 55 (2000) 227-250).

Lepage, P., *et al.*, en Analytical Biochemistry 213 (1993) 40-48, describen métodos recombinantes para la producción de péptidos Rev del VIH-1. Los péptidos se expresan como proteínas de fusión con los dominios de unión a la inmunoglobulina de tipo G (IgG) sintéticos de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los péptidos tienen una longitud de unos 20 aminoácidos mientras que el fragmento de unión a IgG tiene una longitud de unos 170, de modo que la proteína de fusión expresada tiene una longitud total de unos 190 aminoácidos. Esta proteína de fusión es expresada, secretada en forma soluble al medio y purificada mediante cromatografía de afinidad. Los autores expresaron que con este método cabría la posibilidad de producir proteína recombinante en una cantidad de cientos de miligramos por litro de cultivo. No obstante, esta metodología está limitada por el procesamiento alternativo que tiene lugar en la secuencia del péptido señal y varias modificaciones postraduccionales de las proteínas fusionadas y de los péptidos escindidos. Si asumimos que el peso molecular medio de un aminoácido es de 110 Daltons, los péptidos deseados tendrán un peso molecular de unos 2000 a 5000 Daltons mientras que la cola de fusión presenta una longitud mínima de 170 aminoácidos (unos 19000 Da), en caso de que se emplee el dominio de unión a IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como tal cola de fusión. En consecuencia, solo de un 10 a un 25% de la proteína producida de forma recombinante corresponde al péptido deseado.

Otros ejemplos y métodos de producción recombinante de péptidos de pequeño tamaño mediante proteínas de fusión en *E. coli* aparecen descritos en Uhlen, M. y Moks, T., Methods Enzymol. 185 (1990) 129-143; T.J.R.: Expression of eukaryotic genes in *E. coli*, en: Genetic Engineering (Williamson, R. ed.), Academic Press, London, vol. 4, 127-185 (1983); y Kopetzki, E., *et al.*, Clin. Chem. 40 (1994) 688-704. Ningyi, L., *et al.*, Gaojishu Tongxun 10 (2000) 28-31 describen la expresión recombinante del gen de gag p24 en *E. coli*.

La Solicitud internacional WO 02/103026 describe un proceso para la producción de un péptido antifusogénico en forma de péptido de fusión de unos 14 a 70 aminoácidos de longitud en una célula procariota huésped. Este proceso se caracteriza porque, bajo unas condiciones en las que se forman cuerpos de inclusión de dicho péptido de fusión, en la célula huésped se expresa un ácido nucleico que codifica el péptido de fusión que consiste en el péptido antifusogénico mencionado, con una longitud de unos 10 a 50 aminoácidos, unido en su extremo aminoterminal a un péptido anexo de unos 4 a 30 aminoácidos. A continuación se cultiva la célula huésped, se forman los cuerpos de inclusión que se recuperan y solubilizan y, finalmente, se aísla el péptido de fusión en cuestión.

La presente invención tiene por objeto proporcionar un método que permita la producción recombinante de péptidos antifusogénicos con un elevado rendimiento a través de la vía de los cuerpos de inclusión, que resulta conveniente para la producción industrial a gran escala de estos péptidos.

Por lo tanto, la invención proporciona un proceso para la producción recombinante de un péptido antifusogénico mediante los siguientes pasos: la expresión de un ácido nucleico que codifica dicho péptido antifusogénico en forma de un péptido multicopia en una célula microbiana huésped, preferiblemente en una célula huésped procariota; el aislamiento de cuerpos de inclusión que contienen dicho péptido multicopia; la solubilización de los cuerpos de inclusión; y el aislamiento del péptido antifusogénico tras la escisión. Este proceso de escisión se caracteriza por el lavado de los cuerpos de inclusión con un agente desnaturizante a un pH de 6,5 o menor, la solubilización de estos cuerpos de inclusión que contienen el péptido multicopia a un pH mínimo de 9 y la escisión de dicho péptido multicopia para obtener el péptido antifusogénico.

Sorprendentemente se observó que los cuerpos de inclusión que contienen los péptidos multicopia formados por péptidos con actividad antifusogénica repetidos (de ahora en adelante denominados polipéptidos de fusión) son resistentes a las condiciones de desnaturización con valores de pH de 6,5 e inferiores. Sobre la base de esas consideraciones, es posible purificar de forma extremadamente efectiva cuerpos de inclusión que contengan estos péptidos multicopia de los polipéptidos propios de las células huésped y otras impurezas derivadas de estas mediante las condiciones establecidas por la invención, ya que la mayoría de las sustancias que contienen los cuerpos de inclusión son fácilmente solubles bajo estas condiciones de desnaturización y por tanto pueden eliminarse con un simple lavado de los cuerpos de inclusión bajo dichas condiciones de desnaturización.

En un paso ulterior, los cuerpos de inclusión se solubilizan a un pH de 9 o mayor para recuperar el péptido multicopia soluble, no siendo necesario añadir detergentes o agentes desnaturizantes. Después de la solubilización, el péptido multicopia se escinde mediante procedimientos químicos o enzimáticos para obtener el péptido antifusogénico deseado. En una realización preferida de la invención, se sitúa una secuencia de escisión entre los péptidos antifusogénicos que componen el péptido multicopia y pasando este último a ser un polipéptido de fusión caracterizado por el hecho de que las unidades están unidas entre sí por dichas secuencias de escisión, que preferiblemente tiene una longitud aproximada de 1 a 10 aminoácidos. El propio péptido antifusogénico tiene una longitud de 10 a 100 aminoácidos mientras que, para que se dé una expresión estable y la formación de cuerpos de inclusión, la longitud del polipéptido de fusión es preferiblemente de unos 50 aminoácidos como mínimo.

Así, la invención proporciona un método extremadamente sencillo para la producción recombinante de péptidos antifusogénicos a través de la vía de los cuerpos de inclusión sencillamente mediante el lavado de estos últimos y, seguidamente, su solubilización a diferentes valores de pH.

5 Descripción detallada de la invención

El término “antifusogénico” tal como se emplea aquí se refiere a la capacidad que posee un péptido para inhibir o reducir la cantidad de sucesos de fusión que pueden tener lugar entre dos o más estructuras, p. ej. membranas celulares, envueltas víricas o fimbrias en relación a la cantidad de fusión de membranas que tiene lugar entre las estructuras en ausencia del péptido. Son ejemplos de esto mismo los inhibidores peptídicos de lentivirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus respiratorio sincitial (VRS), el virus parainfluenza humano (VPIH), el virus del sarampión y el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). Este tipo de péptidos antifusogénicos derivan de la hélice C de una subunidad transmembrana de una proteína de fusión de la envoltura de un virus del género Lentivirus y se unen a la hélice superenrollada central de la subunidad transmembrana del virus respectivo.

Se prefieren especialmente los péptidos antifusogénicos del VIH-1, en especial fragmentos del péptido C de gp41. La tabla 1 describe ejemplos de péptidos antifusogénicos del VIH-1 que derivan del péptido C de gp41. Estos péptidos antifusogénicos y fragmentos de estos son particularmente útiles para la invención.

TABLA 1

Nombre*	Nombre	Secuencia de aminoácidos (código de una letra)	ID. de SEC. núm.:
T-1249	T1357 ¹⁾	WQEWQKITALLEQAQIQKEKNEYELQKLDKWASLWEEF	1
T-20, DP178	T680 ²⁾	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	2
T-118	RSV118 ³⁾	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKST	3
T-257	MV257 ³⁾	LHRIDLGPPISLERLDVGTNLGNAIAKLEDAKELL	4

* para péptidos acetilados en su extremo aminoterminal o amidados en el carboxiterminal; T-20 (sinónimo de DP178) y T-1249 son del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), T-118 es del virus respiratorio sincitial (VRS) y T-257 es del virus del sarampión.

¹⁾ WO 99/59615

²⁾ Rimsky, L.T., *et al.*, J. Virol. 72 (1998) 986-993

³⁾ Lambert, D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 2186-2191

La longitud del péptido antifusogénico no es crucial. Sin embargo, se prefiere el uso de longitudes de entre unos 10 y 100 aminoácidos. La longitud debe ser suficiente para conferir estabilidad frente a agentes desnaturizantes a valores de pH ácidos. La longitud máxima depende principalmente del manejo adecuado de los polipéptidos de fusión durante el proceso de solubilización, escisión y purificación.

En una realización preferida de la invención, el péptido multicopia de acuerdo con la invención está unido en su extremo aminoterminal a un péptido anexo de entre 4 y 30 aminoácidos, aproximadamente. El propósito de añadir el péptido anexo es conferir propiedades adicionales al péptido antifusogénico, por ejemplo para mejorar la expresión (p. ej. un fragmento aminoterminal de un polipéptido con una tasa de expresión elevada, como el interferón- α -2a), la purificación (p. ej. una cola de histidinas; véase, p. ej., Zhang, J.-H., *et al.*, Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue 36 (4) (2000) 515-517) o para permitir la posterior modificación aminoterminal, como una acetilación o la modificación por PEG.

El péptido anexo consiste en un tramo peptídico corto formado por desde al menos cuatro aminoácidos (metionina y tres aminoácidos más para fines relacionados con la escisión o expresión) hasta unos 30 aminoácidos, preferiblemente de 10 a unos 20 aminoácidos (respecto al contenido de codones del ácido nucleico). La longitud del péptido anexo no es crucial para la invención. No obstante, se prefiere que el péptido anexo sea muy corto para mejorar la producción de péptido antifusogénico. En especial se prefiere que el péptido anexo esté formado por un sitio de escisión adecuado formado por algunos aminoácidos compatibles con un nivel de expresión elevado o que sirvan para mejorar el acceso de las proteasas de escisión (se evita el impedimento estérico) o por algunos aminoácidos como es el caso de marcadores de purificación o inmovilización, como una cola de histidinas (para medios de purificación véase Hengen, P., Trends Biochem. Sci. 20 (1995) 285-286) y la metionina necesaria codificada por el codón de inicio.

El péptido anexo de acuerdo con la invención se emplea en el péptido de fusión preferiblemente también para proteger el extremo aminoterminal del péptido antifusogénico durante la expresión, solubilización, purificación y modificación de los péptidos. Estos péptidos de fusión son especialmente valiosos en un proceso para la producción de péptidos antifusogénicos modificados en su extremo aminoterminal. Un método de este tipo implica la formación del polipéptido recombinante en forma de péptido de fusión cuya parte fusionada protege el extremo aminoterminal. Entonces puede reaccionar el péptido de fusión recombinante con sustancias químicas protectoras para proteger de forma selectiva grupos con cadenas laterales reactivas. A continuación, el péptido de fusión es escindido, con al menos un reactivo de escisión, entre el péptido y la región fusionada para formar un grupo aminoácido terminal reactivo desprotegido. A partir de ese momento el grupo aminoácido terminal reactivo desprotegido puede modificarse con un agente químico como el anhídrido acético o el éster acético de N-hidroxisuccinimida para la acetilación aminoterminal. Entonces, las cadenas laterales quedan selectivamente desprotegidas para formar un péptido modificado en su extremo aminoterminal. Estos métodos están descritos, por ejemplo, en WO 94/01451 o en las patentes estadounidenses núms. US 5 635 371 y US 5 656 456.

La parte correspondiente al péptido anexo presenta preferiblemente una estructura que facilita la purificación o la inmovilización del péptido de fusión. Con este propósito, el péptido anexo contiene preferiblemente una “etiqueta de afinidad” (véase Pandjaitan, B., *et al.*, Gene 237 (1999) 333-342), como una cola de polihistidina (unos 6 residuos de histidina) o similar. Además, el péptido anexo contiene preferiblemente una metionina aminoterminal (codificada por ATG) y uno o más aminoácidos carboxiterminales que codifican un sitio de escisión.

Los péptidos anexos especialmente preferidos de acuerdo con la invención son fragmentos aminoterminales del interferón- α -2a, preferiblemente con una cola de histidinas incluida (aminoácidos en código estándar de una letra):

MCDLPQTHSLGSR (ID. de SEC. núm.: 5)

MSDLPQTHSLGSR (ID. de SEC. núm.: 6)

MSDLPQTHHHHHSLGSR (ID. de SEC. núm.: 7)

Según la invención, los polipéptidos de fusión contienen un sitio de escisión o varios, que pueden ser escindidos de forma enzimática tras la solubilización de los cuerpos de inclusión con una proteasa de escisión específica (proteasa de restricción) o mediante métodos químicos. La proteasa se selecciona teniendo en cuenta la secuencia aminoacídica del péptido antifusogénico que se pretende producir. Se debe tener especial cuidado, en caso de que sea posible, de que la secuencia de reconocimiento/escisión de la proteasa de restricción no aparezca en el péptido antifusogénico ni, preferiblemente, tampoco en el péptido anexo, es decir, solamente debe aparecer en la región de escisión (región de conexión). Algunos ejemplos de endoproteasas de escisión específica son: Factor Xa, trombina, subtilisina, variante BTN de la subtilisina, sistema ubicuitina-proteasa, renina, enterocinasa, collagenasa, proteasa PreScission, tripsina, quimotripsina, endoproteasa Lys-C, calicreína (Carter, P.: en: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E., eds., Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes; ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society, pp. 181-193 (1990)), proteasa TEV (Parks, T.D., *et al.*, Anal. Biochem. 216 (1994) 413-417), IgA proteasa (Pohlner, J., *et al.*, Nature 325 (1987) 458-462), Kex2p proteasa (EP-A 0 467 839) o V8 proteasa de *S. aureus*.

La secuencia del péptido anexo puede aprovechar preferiblemente otras estrategias de diseño que promuevan una escisión eficiente en el entorno de escisión preseleccionado. En concreto, si el agente de escisión preseleccionado es una endoproteasa, es preferible que el péptido anexo sea soluble en medios acuosos. Por tanto, de un modo preferido se incluyen en el péptido anexo los aminoácidos que presentan grupos laterales cargados y propiedades hidrófobas para incentivar la solubilidad, así como cualquier otro aminoácido que mejore el acceso de las proteasas de escisión. Estos aminoácidos son, por ejemplo, Glu y Asp (aniónicos), Arg y Lys (catiónicos) o Ser y Thr (neutrales e hidrófilos). Si se emplea arginina o lisina, debe tenerse en cuenta que estos dos aminoácidos constituyen el sitio de escisión para la tripsina.

El sitio de escisión se selecciona habitualmente de modo que los resultados de la escisión (p. ej., la tripsina escinde después de la Arg y luego la Arg es eliminada por la carboxipeptidasa B). En consecuencia, el sitio de escisión está situado en un extremo de cada péptido de fusión, preferiblemente en el extremo aminoterminal. Esto también se prefiere en el caso en que el polipéptido de fusión no contenga un péptido anexo como el antes definido, dado que ese sitio de fusión pueden emplearse para la protección intermedia del extremo aminoterminal durante la modificación química del péptido. Los sitios de escisión enzimática o química y los agentes correspondientes utilizados para realizar la escisión de un enlace peptídico cercano a uno de los sitios están descritos en, por ejemplo, WO 92/01707 y WO 95/03405.

En la tabla 2 que aparece a continuación se muestran ejemplos de enzimas de escisión y de la secuencia de escisión:

TABLA 2

Enzima	Secuencia de escisión ¹⁾	ID. de SEC. Núm.:
Enterocinasa	DDDDK	8
Factor Xa	IEGR	9
Trombina	GPR	10
Ubicuitina	RGG	
Renina	HPFHL-LVY	11
Tripsina	K o R	
Quimotripsina	F o Y o W	
Clostripaína	R	
LysC Endoproteasa	K	
V8 de <i>S. aureus</i>	E	

Escisión química

Substancia de escisión	Secuencia de escisión ¹⁾
BrCN	M
BNPS-escatol	W
2-Nitro-5-tiocianobenzoato	C

¹⁾ Aminoácidos en código de una letra.

La tripsina, que escinde proteínas y péptidos de forma específica en el extremo carboxiterminal de los aminoácidos arginina y lisina, se emplea preferiblemente. Estas enzimas se conocen procedentes de, por ejemplo, páncreas porcino, bovino y humano, de levaduras recombinantes o de *E. coli* (WO 99/10503). La tripsina es particularmente adecuada para la producción de los polipéptidos deseados, siempre que los residuos de lisina estén protegidos.

En el caso de la presente invención, la secuencia peptídica que puede ser escindida por una endoproteasa se entiende como una secuencia peptídica de cadena corta que está compuesta preferiblemente por un número de aminoácidos entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 3, y contiene un sitio de escisión carboxiterminal para la endoproteasa deseada. Este péptido anexo contiene además de forma preferible una combinación de varios aminoácidos (primera parte) entre el extremo aminoterminal y la secuencia de reconocimiento para la endoproteasa deseada, preferiblemente seleccionada de aminoácidos hidrófilos como Gly, Thr, Ser, Ala, Pro, Asp, Glu, Arg y Lys. Como esta primera parte se emplea preferiblemente un segmento de aminoácidos en el que de dos a ocho de estos aminoácidos adicionales son los aminoácidos Arg o Glu cargados negativamente.

También es posible realizar la escisión empleando BrCN (escisión química) siempre y cuando el péptido antifusogénico no contenga metionina.

En otra realización preferida de la invención, el péptido antifusogénico contiene una glicina en su extremo carboxi-terminal. Esta glicina sirve para realizar la inmediatamente posterior amidación carboxiterminal enzimática (Bradbury, A.F. y Smyth, D.G., Trends Biochem. Sci. 16 (1991) 112-115).

Consecuentemente, los elementos que componen los polipéptidos de fusión son preferiblemente los siguientes:

- péptido antifusogénico,
- sitio de escisión,
- péptido anexo para facilitar la expresión o purificación,
- glicina en el extremo carboxiterminal.

Los sitios de escisión son necesarios para la liberación del péptido antifusogénico del resto de elementos del polipéptido de fusión. Por lo tanto, los sitios de escisión se sitúan entre los péptidos antifusogénicos en el polipéptido de fusión, preferiblemente en forma de grupo protector aminoterminal.

Según la invención, una unidad de péptido antifusogénico se sobreexpresa en microorganismos, como los procariotas, bajo condiciones en las que se forman cuerpos de inclusión de proteínas insolubles que contienen dicho péptido y otros polipéptidos. Las propiedades que propone la invención se encuentran ya cuando solamente hay una repetición de la unidad del péptido de fusión (dos secuencias idénticas de péptido antifusogénico). Sin embargo, también es posible utilizar polipéptidos de fusión que tengan más de una unidad de repetición, es decir, cinco, diez o hasta veinte secuencias idénticas de péptido antifusogénico. El péptido de fusión que se desea producir debe tener una longitud suficiente para que la expresión sea estable y para que se formen cuerpos de inclusión en la célula huésped. Normalmente, los genes que codifican al menos unos 80 aminoácidos, preferiblemente >100, se expresan de modo estable, no son degradados y se precipitan en forma de cuerpos de inclusión. No existe un límite superior real de la cantidad de unidades repetidas. No obstante, expresar genes que codifican más de 3000 aminoácidos resulta difícil y aberrante.

Los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Streptomyces* o *Bacillus* son ejemplos de organismos huésped procariotas adecuados. La levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*) son los organismos huésped eucariotas preferidos. Para la producción de los péptidos de fusión según la invención los microorganismos son transformados del modo habitual con el vector que contiene el DNA que codifica el péptido y posteriormente se produce el proceso de fermentación del modo habitual.

Los cuerpos de inclusión se encuentran en el citoplasma y contienen el péptido multicopia en una forma agregada no hidrosoluble. Este tipo de proteínas de cuerpos de inclusión se encuentran habitualmente en forma desnaturalizada (p. ej., puentes disulfuro unidos aleatoriamente). Estos cuerpos de inclusión se separan de otros componentes celulares mediante, por ejemplo, centrifugación tras la lisis celular.

Según la invención, los cuerpos de inclusión se lavan bajo condiciones desnaturalizantes a un pH menor de 6,5, preferiblemente a un pH aproximado entre 3 y 5. Sorprendentemente, estas condiciones desnaturalizantes no solubilizan el polipéptido de fusión en un grado considerable, pero sí solubilizan gran cantidad de las impurezas derivadas de la célula huésped que incluyen polipéptidos. Estos agentes desnaturalizantes son ampliamente conocidos en el ámbito y, por ejemplo, son soluciones muy concentradas de clorhidrato de guanidinio (p. ej. unos 6 mol/l) o de urea (p. ej., unos 8 mol/l). El agente desnaturalizante se emplea preferiblemente en forma de solución tamponada.

Tras el lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan a valores alcalinos de pH 9 o mayor, preferiblemente sin la adición de detergentes o agentes desnaturalizantes. De forma inesperada, se observó además que estas condiciones alcalinas permiten solubilizar los polipéptidos de fusión de modo suficiente. Después de la solubilización, el polipéptido de fusión puede ser escindido para recuperar el péptido antifusogénico.

Tras la solubilización, se puede purificar el péptido de fusión o péptido antifusogénico de un modo sencillo, como por ejemplo mediante cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de fase inversa.

El resto de pasos siguientes del proceso para la construcción de vectores de expresión adecuados y la expresión génica pertenecen a las técnicas más novedosas conocidas por cualquier experto en el campo. Estos métodos se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Existe un gran número de publicaciones que describen la producción recombinante de proteínas en microorganismos/procariotas mediante la vía de los cuerpos de inclusión. Misawa, S., *et al.*, Biopolymers 51 (1999) 297-307; Lilie, H., Curr. Opin. Biotechnol. 9 (1998) 497-501 y Hockney, R.C., Trends Biotechnol. 12 (1994) 456-463 son ejemplos de estas revisiones.

Los péptidos de acuerdo con la invención se sobreexpresan en microorganismos/procariotas. La sobreexpresión conduce a la formación de cuerpos de inclusión. La metionina codificada por el codón de inicio y mencionada en los anteriores ejemplos se elimina principalmente durante la expresión/traducción en la célula huésped. Los métodos generales de sobreexpresión de proteínas en microorganismos/procariotas se conocen ampliamente en el ámbito desde mucho tiempo atrás. Las siguientes referencias son ejemplos de publicaciones en el ámbito: Skelly, J.V., *et al.*, Methods Mol. Biol. 56 (1996) 23-53; Das, A., Methods Enzymol. 182 (1990) 93-112; y Kopetzki, E., *et al.*, Clin. Chem. 40 (1994) 688-704.

La sobreexpresión en procariotas significa la expresión empleando casetes de expresión optimizados (patente estadounidense US 6 291 245) con promotores como el promotor tac o el promotor lac (EP-B 0 067 540). Normalmente, esto puede realizarse empleando vectores que contengan promotores de inducción química o promotores de inducción por cambio de temperatura. Uno de los promotores útiles para *E. coli* es el promotor λ PL sensible a la temperatura (véase la patente europea EP-B 0 041 767). Otro promotor eficiente es el promotor tac (véase la patente estadounidense núm. US 4 551 433). Estas potentes señales de regulación para procariotas como *E. coli* normalmente se originan en bacteriófagos que infectan bacterias (véase Lanzer, M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 8973-8977; Knaus, R. y Bujard, H., EMBO Journal 7 (1988) 2919-2923; para el promotor λ T7: Studier, F.W., *et al.*, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89; para el promotor T5: EP-A 0 186 069; Stüber, D., *et al.*, System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis; en: Immunological Methods IV (1990) 121-152).

Empleando estos sistemas superproductivos de expresión en células procariotas, los péptidos según la invención se producen en cantidades que al menos constituyen el 10% de la cantidad total de proteína expresada por la célula, de forma característica un 30-40% y, ocasionalmente, hasta un 50%.

El término "cuerpos de inclusión" tal como aquí se usa hace referencia a una forma insoluble de polipéptidos producidos de forma recombinante tras la sobreexpresión del ácido nucleico que los codifica en microorganismos/procariotas. Este fenómeno es ampliamente conocido entre las técnicas más novedosas y está revisado, por ejemplo, por Misawa S. y Kumagai, I., Biopolymers 51 (1999) 297-307; Guise, A.D., *et al.*, Mol. Biotechnol. 6 (1996) 53-64; y Hockney *et al.*, Trends Biotechnol. 12 (1994) 456-463.

La solubilización de los cuerpos de inclusión se realiza preferiblemente empleando soluciones acuosas con valores de pH de aproximadamente 9 o mayores. El valor de pH más preferido es de 10,0 o mayor. Para la solubilización no es necesario añadir detergentes o agentes desnaturalizantes. El valor de pH optimizado puede determinarse fácilmente según el ejemplo 7. Resulta obvio que existe un margen optimizado de pH dado que las fuertes condiciones alcalinas pueden desnaturalizar los polipéptidos. Este margen optimizado se encuentra entre pH 9 y pH 12.

Los ácidos nucleicos (DNA) que codifican el péptido de fusión se pueden producir según los métodos conocidos en el ámbito. También se prefiere realizar la extensión de la secuencia de ácido nucleico mediante elementos de regulación y transcripción adicionales, para así optimizar la expresión en la célula huésped. Un ácido nucleico (DNA) adecuado para la expresión puede producirse preferiblemente mediante síntesis química. Estos procesos les resultarán familiares a los expertos en la materia y están descritos, por ejemplo, en Beattie, K. L. y Fowler, R. F., Nature 352 (1991) 548-549; EP-B 0 424 990; e Itakura, K., *et al.*, Science 198 (1977) 1056-1063. También puede ser conveniente modificar la secuencia de ácidos nucleicos de los péptidos según la presente invención.

Estas modificaciones son, por ejemplo:

- la modificación de la secuencia de ácido nucleico con el fin de introducir diversas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para facilitar los pasos de ligación, clonación y mutagénesis;

- la modificación de la secuencia de ácido nucleico para incorporar los codones preferidos en el caso de la célula huésped en cuestión;

- la extensión de la secuencia de ácido nucleico mediante elementos de regulación y transcripción adicionales, para así optimizar la expresión génica en la célula huésped.

Se presentan los siguientes ejemplos, referencias, lista de secuencias y la figura 1 para ayudar a la comprensión de la presente invención cuyo auténtico ámbito de aplicación se expone en las reivindicaciones anexas. Cabe resaltar que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 muestra el vector de expresión pBRori-URA3-LACI-RFN-Edel.

Material de inicio

El sistema *E. coli* huésped/vector (cepa huésped de *E. coli* y vector básico) empleado para la expresión de las proteínas precursoras de péptido multimérico de acuerdo con la invención está descrito en la patente estadounidense núm. US 6 291 245.

Métodos generales

Técnica de DNA recombinante

- 5 Se utilizaron métodos estándar para la manipulación de DNA, tal como se describen en Sambrook, J., *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se emplearon siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de proteínas

- 10 La concentración proteica de la proteína de fusión multimérica T-repeat se determinó mediante el cálculo de la densidad óptica (DO) a 280 nm, empleando el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos [T-repeat: $\epsilon = 148680 \text{ cm}^2/\text{mol}$; IFN- α -2a: $\epsilon = 18020 \text{ cm}^2/\text{mol}$; F9a = $44650 \text{ cm}^2/\text{mol}$].

15 Ejemplo 1

Síntesis del gen de fusión T-repeat

1.1 Diseño del gen de fusión T-repeat

- 20 El gen de fusión T-repeat artificial codifica una proteína de fusión de 217 aminoácidos cuyo peso molecular es de 27.242 Da. La proteína de fusión está formada por los 13 aminoácidos aminotermiales del interferón- α -2a humano [MCDLPQTHSLGSR (ID. de SEC. núm.: 5); péptido transportador] y 5 copias del péptido T-1357 inhibidor del VIH [WQEWEQKITALLEQAQIQKEKNEYELQKLDKWASLWEWF (ID. de SEC. núm.: 1), péptido diana], que están
25 conectados mediante conectores peptídicos de escisión por tripsina (GR).

- Con el fin de insertar el gen estructural T-repeat dentro del plásmido de expresión de *E. coli* pBRori-URA3-LacI-RFN-Edel (producción y descripción: véase el ejemplo 2), se insirió un sitio de unión a ribosomas sintético RBSII y un único sitio de escisión de EcoRI en dirección 5' en el extremo 5' y un único sitio de escisión para la endonucleasa
30 de restricción CelII en dirección 5' en el extremo 3'.

1.2 Síntesis del gen de fusión T-repeat

- El gen RBSII T-repeat, cuya longitud es de unos 690 pb, que está flanqueado por un sitio único de escisión para
35 EcoRI y para la endonucleasa de restricción CelII, se preparó a partir de oligonucleótidos mediante síntesis química. El gen RBSII T-repeat bicatenario se construyó hibridando y ligando los oligonucleótidos y posteriormente se clonó como un fragmento EcoRI/CelII con una longitud de 691 pb dentro de un plásmido de *E. coli*. El plásmido deseado se designó pT-repeat. La secuencia de DNA predeterminada del gen clonado RBSII T-repeat fue confirmada mediante
40 secuenciación de DNA.

40 Ejemplo 2

Construcción de los plásmidos de expresión en *E. coli*

- 45 2.1 Construcción del plásmido pBRori-URA3-LacI-RFN-Edel inicial

- El plásmido pBRori-URA3-LacI-RFN-E es un vector de expresión para el interferón- α -2a (IFN- α -2a) en *E. coli*. Está basado en el plásmido OripBR-URA3-EK-IFN de expresión de IFN- α -2b (Patente estadounidense núm. US 6 291 245). El plásmido pBRori-URA3-LacI-RFN-EdeI difiere del OripBR-URA3-EK-IFN en que posee además un gen re-
50 presor *lacI* y un gen del IFN- α -2a en lugar de un gen de IFN- α -2b. IFN- α -2a y IFN- α -2b solamente difieren en un aminoácido en la posición 21 (intercambio de Lys21 por Arg) El gen represor *lacI* proviene del plásmido pUHA1 (Stüber, D., *et al.*, System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis; en: Immunological Methods IV (1990) 121-152). Se amplificó mediante
55 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el método descrito por Mullis, K.B. y Faloona, F.A., en Methods Enzymol. 155 (1987) 335-350, empleando los cebadores N1 (ID. de SEC. núm.: 12) y N2 (ID. de SEC. núm.: 13)

Not1

- 60 N1 : 5' -AAAAAAGCGGCCGCGACAATTCGCGCGCGAAGGCG-3'

Not1

- 65 N2 : 5' -AAAAAAGCGGCCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGG-3'

y posteriormente se ligó como un fragmento NotI de una longitud de unos 1210 pb en el único sitio de escisión para NotI de OripBR-URA3-EK-IFN.

2.2 Construcción del vector de expresión pBRori-URA3-LacI-T-repeat

El gen T-repeat se aisló como un fragmento EcoRI/CeIII de una longitud de unas 690 pb del plásmido pT-repeat (véase el ejemplo 1.2) y posteriormente se ligó dentro del fragmento del vector pBRori-URA3-LacI-RFN de unas 3,1 kpb digerido con EcoRI y CeIII. El plásmido pBRori-URA3-LacI-T-repeat deseado se identificó mediante mapas de restricción y el gen T-repeat subclonado se verificó de nuevo mediante secuenciación de DNA.

Ejemplo 3

Expresión del gen T-repeat en *E. coli*

Para la expresión del gen de fusión según la invención se empleó un sistema huésped *E. coli*/vector que permite la selección de plásmidos sin antibióticos mediante la complementación de una auxotrofia de *E. coli* (PyrF) (Patente estadounidense núm. US 6 291 245).

3.1 Transformación y cultivo celular mediante complementación de una auxotrofia para pyrF en medio selectivo

Con el propósito de expresar el gen T-repeat, se transformó una cepa de *E. coli* K12 [designada UT5600(ApyrF)] con el plásmido de expresión pBRori-URA3-LacI-T-repeat descrito en el ejemplo 2.2. Las células UT5600(ApyrF)/pBRori-URA3-LacI-T-repeat transformadas se cultivaron en primer lugar a 37°C sobre placas de agar y posteriormente en un cultivo en agitación en medio mínimo M9 complementado con casaminoácidos al 0,5% (Difco) hasta una densidad óptica a 550 nm (DO_{550}) de 0,6-0,9 para, a continuación, inducir las con IPTG (concentración final de 1-5 mmol/l). Tras una fase de inducción de 4 a 16 horas a 37°C, las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con tampón de fosfato potásico 50 mmol/l, pH 6,5, y se conservaron a -20°C para siguientes procesados.

3.2 Análisis de expresión

Para el análisis de la expresión se resuspendieron precipitados celulares de 3 unidades de DO_{550nm} (1 DO_{550nm} = 1 ml suspensión celular con una DO a 550 nm de 1) de medio de cultivo centrifugado en 0,25 ml de tampón de fosfato potásico 10 mmol/l, pH 6,5, y las células se lisaron mediante tratamiento ultrasónico (dos pulsos de 30 s a una intensidad del 50%). Se provocó la sedimentación de los componentes celulares insolubles (14.000 rpm, 5 min) y se mezcló el sobrenadante con 1/5 volúmenes (vol) de tampón de muestra 5xSDS (tampón de muestra 1xSDS: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 6,8, SDS 1%, DTT 50 mmol/l, glicerol al 10%, azul de bromofenol 0,001%). La fracción de residuos celulares insolubles (pellet o precipitado) se resuspendió en 0,3 ml de tampón de muestra 1xSDS, las muestras se incubaron durante 5 min a 95°C y se centrifugaron de nuevo. Seguidamente, las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) y se tiñeron con colorante Coomassie Brilliant Blue R.

La proteína de fusión T-repeat sintetizada era homogénea y se encontró de forma exclusiva en la fracción de residuos celulares insolubles en forma de agregados de proteínas insolubles, los denominados cuerpos de inclusión. El rendimiento de la expresión, dentro de los márgenes de precisión de la medición, fue comparable en todos los clones y fue de entre el 30 y el 60% en relación a la proteína de *E. coli* total.

Ejemplo 4

Fermentaciones a 10 l de *E. coli* a una densidad celular elevada para la producción recombinante de precultivo de T-repeat

Con el fin de preparar el precultivo, se inocularon 300 ml de medio M9plus (medio M9 complementado con casaminoácidos al 0,5% y 0,9 g/l de cada uno de Trp, Pro y Leu) con 1 ml de una reserva en glicerol de *E. coli* UT5600ApyrF pBRori-URA3-lacI-T-repeat en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. El cultivo se incubó durante unas 6 horas a 37°C en un agitador excéntrico a 150 rpm hasta alcanzar una DO_{578nm} de 3,0.

Fermentación alimentada (fed-batch) principal a 10 l

Al inicio de la fermentación, el precultivo se transfirió al fermentador de 10 l de capacidad. Se realizó el cultivo principal en medio salino M9 definido complementado con glicerol al 1,4% en lugar de glucosa, casaminoácidos al 2% y los aminoácidos Trp, Pro y Leu al 0,1% cada uno de ellos hasta alcanzar una DO_{578nm} de 20. Seguidamente, se inició la alimentación del cultivo con una dosis de glicerol-levadura (solución madre: 30% de extracto de levadura y 33% de glicerol), variando la velocidad de flujo del mismo entre 0,8 y 3,5 ml/min en función del desarrollo del valor de pH del cultivo para así evitar cualquier otra adición de sustancias correctoras (H_3PO_4 , KOH). El pH se mantuvo a 7,0 y el valor de pO_2 se mantuvo al 50% mediante el control de las revoluciones por minuto. A una DO_{578nm} de 70 se añadieron 1,5 mmol/l de IPTG y se indujo la expresión génica de las proteínas. La fermentación en total duró unas 36 horas y se finalizó a una DO_{578nm} de 160-180.

ES 2 280 673 T3

Recogida de la biomasa

El contenido del fermentador se centrifugó con una centrífuga de flujo continuo (13000 rpm, 13 l/h) y se conservó la biomasa cultivada a -20°C hasta nuevo procesado.

Ejemplo 5

5.1 Métodos estándar: lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión

Se suspendieron 200 g de células *E. coli* (peso fresco) en Tris-HCl a 110,1 mol/l, pH 7,0 y a 0°C, se añadieron 300 mg de lisozima y la mezcla se incubó durante 20 minutos a 0°C. Posteriormente se lisaron las células por completo de forma mecánica mediante dispersión a alta presión y el DNA se digirió durante 30 minutos a 25°C al añadir 2 ml de MgCl₂ 1 mol/l y 10 mg de desoxirribonucleasa. Seguidamente se añadieron 500 ml de EDTA 60 mmol/l, Triton X-100 6% y NaCl 1,5 mol/l, pH 7,0, a la solución de lisis y la mezcla se incubó durante otros 30 minutos a 0°C. Posteriormente se sedimentaron los componentes insolubles (residuos celulares y cuerpos de inclusión) mediante centrifugación.

Se suspendió el precipitado en 1 l de Tris-HCl 0,1 mol/l, EDTA 20 mmol/l, pH 6,5, se incubó durante 30 minutos a 25°C y la preparación de cuerpos de inclusión se aisló mediante centrifugación.

5.2 Métodos de acuerdo con la invención: lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión

Se suspendieron 200 g de células *E. coli* (peso fresco) en 1 l de tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,0, se añadieron 300 mg de lisozima y la mezcla se incubó durante 20 minutos a 0°C. Posteriormente se lisaron las células por completo de forma mecánica mediante dispersión a alta presión, el DNA se digirió durante 30 minutos a 25°C al añadir 2 ml de MgCl₂ 1 mol/l y 10 mg de desoxirribonucleasa y los componentes insolubles (residuos celulares y cuerpos de inclusión) se sedimentaron por centrifugación. A continuación, se lavó el precipitado dos veces con tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,0. Con este fin, el precipitado se suspendió dos veces en 1 l de tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,5, se incubó durante 30 minutos a 25°C bajo agitación y se aisló mediante centrifugación.

5.3 Métodos de acuerdo con la invención: lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión de gran pureza

Se suspendieron 200 g de células *E. coli* (peso fresco) en 1 l de tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,0, a 0°C; se añadieron 300 mg de lisozima y la mezcla se incubó durante 20 minutos a 0°C. Posteriormente se lisaron las células por completo de forma mecánica mediante dispersión a alta presión, el DNA se digirió durante 30 minutos a 25°C al añadir 2 ml de MgCl₂ 1 mol/l y 10 mg de desoxirribonucleasa y los componentes insolubles (residuos celulares y cuerpos de inclusión) se sedimentaron por centrifugación.

A continuación, se lavó el precipitado dos veces; la primera con clorhidrato de guanidinio 5,5 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0, y la segunda con urea 8 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0. Con este fin, el precipitado se suspendió dos veces (en clorhidrato de guanidinio 5,5 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0 y en urea 8 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0), se incubó durante 10-30 minutos a 25°C bajo agitación y se aisló mediante centrifugación.

A continuación, se lavó el precipitado dos o tres veces con tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,0. Con este fin, el precipitado se suspendió dos o tres veces en 1 l de tampón de fosfato potásico 0,1 mol/l, pH 5,5, se incubó durante 30 minutos a 25°C bajo agitación y se aisló mediante centrifugación.

Ejemplo 6

Solubilidad de los cuerpos de inclusión de T-repeat comparados con los cuerpos de inclusión “estándar” (IFN- α -2a y F9a) en presencia de agentes desnaturalizantes dentro del intervalo ácido

Los cuerpos de inclusión a analizar [IFN- α -2a: preparado como se describe en los ejemplos 2.1, 3.1, 4 y 5.1, exceptuando que se emplearon células UT5600(ApyrF)/pBRori-URA3-LacI-RFN-Edel en lugar de células UT5600 (ApyrF)/pBRori-URA3-LacI-T-repeat; F9a: preparado como se describe en WO 97/47737; T-repeat: preparado como se describe en los ejemplos 2.2, 3.1, 4 y 5.2] se resuspendieron a una concentración de 1 g/20 ml de cada en

a) clorhidrato de guanidinio 5,5 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0, y

b) urea 8 mol/l y EDTA 10 mmol/l, pH 3,0.

a temperatura ambiente bajo agitación.

Pasadas 12-24 horas, se tomó una muestra de 200 μ l en cada caso, se provocó la sedimentación de los componentes insolubles mediante centrifugación (centrífuga Eppendorf 5415, 14.000 rpm, 10 min) y se mezclaron 80 μ l de sobrenadante con 20 μ l de tampón de muestra 5xSDS (tampón de muestra 1xSDS: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 6,8, SDS 1%, DTT 50 mmol/l, glicerol al 10%, azul de bromofenol 0,001%). Los sobrenadantes que contenían clorhidrato de guanidinio 5,5 mol/l se dializaron frente a urea 8 mol/l previamente a la SDS-PAGE. El precipitado insoluble se lavó una vez con 200 μ l de tampón de fosfato potásico, pH 5,0, y seguidamente se resuspendió en 250 μ l de tampón de muestra 1xSDS.

ES 2 280 673 T3

Todas las muestras se incubaron 5 minutos a 95°C antes de la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS y se tiñeron con colorante Coomassie Brilliant Blue R. A continuación, se analizaron las bandas relevantes del gel por densitometría para la determinación del contenido en polipéptidos (Tabla 3).

TABLA 3a

Clorhidrato de guanidinio 5,5 mol/l, EDTA 10 mmol/l, pH 3

Proteína	sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %
T-Repeat	3	97
IFN- α -2a	94	6
F9a	89	11

TABLA 3b

Urea 8 mol/l, EDTA 10 mmol/l, pH 3

Proteína	sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %
T-Repeat	9	91
IFN- α -2a	98	2
F9a	90	10

Ejemplo 7

Solubilidad de los cuerpos de inclusión de T-repeat comparados con los cuerpos de inclusión "estándar" (IFN- α -2a y F9a) en tampones acuosos dentro del intervalo alcalino

Los cuerpos de inclusión de IFN- α -2a, F9a y T-repeat a solubilizar (producidos según la descripción del ejemplo 6) se incubaron en

a) Tris HCl 50 mmol/l y

b) NaHCO₃ 50 mmol/l, respectivamente,

a los valores de pH que se quiere ensayar (8,0; 9,0; 10,0; 11,0 y 12,0) a temperatura ambiente bajo agitación. Pasadas 4 horas, se tomó una muestra de 200 μ l en cada caso y se provocó la sedimentación de los componentes insolubles por centrifugación (14000 rpm, 15 min). Se mezclaron 80 μ l de sobrenadante con 20 μ l de tampón de muestra 5xSDS (tampón de muestra 1xSDS: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 6,8, SDS 1% , DTT 50 mmol/l, glicerol al 10%, azul de bromofenol 0,001%). El precipitado insoluble se lavó una vez con 200 μ l de tampón de fosfato potásico 50 mmol/l, pH 6,5, y seguidamente se resuspendió en 250 μ l de tampón de muestra 1xSDS. Las muestras se incubaron 5 minutos a 95°C antes de la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS y se tiñeron con colorante Coomassie Brilliant Blue R. A continuación, se analizaron las bandas relevantes del gel por densitometría para la determinación del contenido en polipéptidos (Tabla 4).

ES 2 280 673 T3

TABLA 4a

IFN- α -2a

pH	Tris HCl 50 mmol/l		NaHCO ₃ 50 mmol/l	
	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %
8,0	0,5	99,5	-	-
9,0	1	99	0,7	99,3
10,0	-	-	1,3	98,7
11,0	-	-	8,0	92
12,0	-	-	5,3	94,7

TABLA 4b

F9a

pH	Tris HCl 50 mmol/l		NaHCO ₃ 50 mmol/l	
	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %
8,0	0	100	-	-
9,0	0	100	0,3	99,7
10,0	-	-	0,3	99,7
11,0	-	-	2,2	97,8
12,0	-	-	43	57

ES 2 280 673 T3

TABLA 4c

T-Repeat

pH	Tris HCl 50 mmol/l		NaHCO ₃ 50 mmol/l	
	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %	Sobrenadante (soluble) %	Precipitado (insoluble) %
8,0	35	65	5	95
9,0	72	28	49	51
10,0	92	8	64	36
11,0	-	-	97	3
12,0	-	-	97	3

Ejemplo 8

8.1 Métodos estándar: solubilización de cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes

Se suspendieron 20 g de precipitado de cuerpos de inclusión (peso fresco) en 200 ml de tampón Tris-HCl 50 mmol/l, clorhidrato de guanidinio 6 mol/l (o urea 8 mol/l) y EDTA 10 mmol/l, pH 7,0, mediante 2 horas de agitación a 25°C. Los componentes insolubles se separaron por centrifugación y el sobrenadante transparente se siguió procesando.

8.2 Métodos de acuerdo con la invención: solubilización de cuerpos de inclusión en tampones acuosos ligeramente alcalinos

Se suspendieron 10 g de cuerpos de inclusión precipitados (peso fresco) en 200 ml de tampón Tris-HCl 50 mmol/l, pH 9 (o tampón NaHCO₃ 50 mmol/l, pH 9-10) mediante 4-16 horas de agitación a 25°C. Los componentes insolubles se separaron por centrifugación y el sobrenadante transparente se siguió procesando [opcionalmente tras la obtención de derivados de los grupos amino primarios de la proteína de fusión T-repeat (grupo ε-amino de lisina) con anhídrido citracónico] mediante escisión enzimática con tripsina.

Listado de referencias

Andersson, L., et al., *Biopolymers* 55 (2000) 227-250

Arthur, L.O., et al., *Science* 258 (1992) 1935-1938

Beattie, K. L. y Fowler, R. F., *Nature* 352 (1991) 548-549

Bradbury, A.F. y Smyth, D.G., *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 112-115

Bullough, P.A., et al., *Nature* 371 (1994) 37-43 Cao, J., et al., *J. Virol.* 67 (1993) 2747-2755

Carr, C.M. y Kim, P.S., *Cell* 73 (1993) 823-832

Carter, P.: en: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E., eds., *Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes*; ACS Symposium Series No. 427, American Chemical Society, pp. 181-193 (1990)

Chan, D.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15613-15617

Chan, D.C., et al., *Cell* 89 (1997) 263-273

ES 2 280 673 T3

- Chan, D.C., et al.,** *Cell* 93 (1998) 681-684
- Chen, C.H., et al.,** *J. Virol.* 69 (1995) 3771-3777
- 5 **Das, A.,** *Methods Enzymol.* 182 (1990) 93-112
- EP-A 0 186 069
- EP-A 0 467 839
- 10 EP-B 0 424 990
- EP-B 0 041 767
- 15 EP-B 0 067 540
- Gallaher, W.R., et al.,** *Aids Res. Hum. Retrovirus* 5 (1989) 431-440
- Guisse, A.D., et al.,** *Mol. Biotechnol.* 6 (1996) 53-64
- 20 **Hammarskjöld, M.-L., et al.,** *Biochim. Biophys. Acta* 989 (1989) 269-280
- Hengen, P.,** *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 285-286
- 25 **Hockney, R.C.,** *Trends Biotechnol.* 12 (1994) 456-463
- Itakura, K., et al.,** *Science* 198 (1977) 1056-1063
- Jakubke, H.D.,** Peptide, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996), p. 198
- 30 **Jones, J.H.,** *J. Pept. Sci.* 6 (2000) 201-207
- Judice, J. K., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 13426-13430
- 35 **Kilby, J.M., et al.,** *Nature Medicine* 4 (1998) 1302-1307
- Knaus, R. y Bujard, H.,** *EMBO Journal* 7 (1988) 2919-2923
- Kopetzki, E., et al.,** *Clin. Chem.* 40 (1994) 688-704
- 40 **Laemmli, U.K.,** *Nature* 227 (1970) 680-685
- Lambert, D.M., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2186-2191
- 45 **Lanzer, M., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8973-8977
- Lawless, M.K., et al.,** *Biochemistry* 35 (1996) 13697-13708
- Lepage, P., et al.,** *Analytical Biochemistry* 213 (1993) 40-48
- 50 **Lilie, H.,** *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 497-501
- Maddon, P.J., et al.,** *Cell* 47 (1986) 333-348
- 55 **Malashkevich, V.N., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 9134-9139
- McDougal, J.S., et al.,** *Science* 231 (1986) 382-385
- Mergler, M., et al.,** *Tetrahedron Letters* 29 (1988) 4005-4008 and 4009-4012
- 60 **Misawa, S., et al.,** *Biopolymers* 51 (1999) 297-307
- Mullis, K.B. y Faloona, F.A.,** *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335-350
- 65 **Ningyi, L., et al.,** *Gaojishu Tongxun* 10 (2000) 28-31
- Pandjaitan, B., et al.,** *Gene* 237 (1999) 333-342

Parks, T.D., et al., *Anal. Biochem.* 216 (1994) 413-417

Pohlner, J., et al., *Nature* 325 (1987) 458-462

5 **Rimsky, L.T., et al.,** *J. Virol.* 72 (1998) 986-993

Root, M.J., et al., *Science* 291 (2001) 884-888

10 **Sambrook et al.,** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Skelly, J.V., et al., *Methods Mol. Biol.* 56 (1996) 23-53

15 **Stuber, D., et al.,** System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis; In: *Immunological Methods IV* (1990) 121-152

Studier, F.W., et al., *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89

20 **Tan, K., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12303-12308

Turner, B.G. y Summers, M.F., *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 1-32

Patente estadounidense núm. US 4 551 433

25 Patente estadounidense núm. US 5 464 933

Patente estadounidense núm. US 5 635 371

30 Patente estadounidense núm. US 5 656 456

Patente estadounidense núm. US 5 656 480

Patente estadounidense núm. US 6 013 263

35 Patente estadounidense núm. US 6 017 536

Patente estadounidense núm. US 6 020 459

40 Patente estadounidense núm. US 6 060 065

Patente estadounidense núm. US 6 093 794

Patente estadounidense núm. US 6 291 245

45 **Uhlen, M. y Moks, T.,** *Methods Enzymol.* 185 (1990) 129-143

Weissenhorn, W., et al., *Nature* 387 (1997) 426-430

50 **Wild, C.T., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9770-9774

Wilson, I.A., et al., *Nature* 289 (1981) 366-373

WO 00/69902

55 WO 02/103026

WO 92/01707

60 WO 94/01451

WO 95/03405

WO 96/19495

65 WO 96/40191

WO 99/10503

ES 2 280 673 T3

WO 99/48513

WO 99/59615

5 **Zhang, J.-H., et al.**, Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue 36(4) (2000) 515-517

Zhao, X., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 14172-14177

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción recombinante de un péptido antifusogénico mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica dicho péptido antifusogénico en forma de péptido multicopia en una célula microbiana huésped, el aislamiento de cuerpos de inclusión que contienen dicho péptido multicopia, la solubilización de los cuerpos de inclusión y el aislamiento del péptido antifusogénico tras la escisión. Este proceso de escisión se **caracteriza** por el lavado de los cuerpos de inclusión con un desnaturalizante a un pH de 6,5 o menor, la solubilización de estos cuerpos de inclusión que contienen el péptido multicopia a un pH mínimo de 9 y la escisión de dicho péptido multicopia para obtener el péptido antifusogénico.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que el lavado se realiza a un valor de pH entre 3 y 5.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** por el hecho de que dicho péptido multicopia es escindido durante la solubilización de los cuerpos de inclusión o después de esta.

4. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión formado por (en dirección de aminoterminal a carboxi-terminal)

- a) un péptido antifusogénico en forma de péptido multicopia de al menos dos secuencias antifusogénicas idénticas;
- b) un sitio de escisión situado entre los péptidos antifusogénicos.

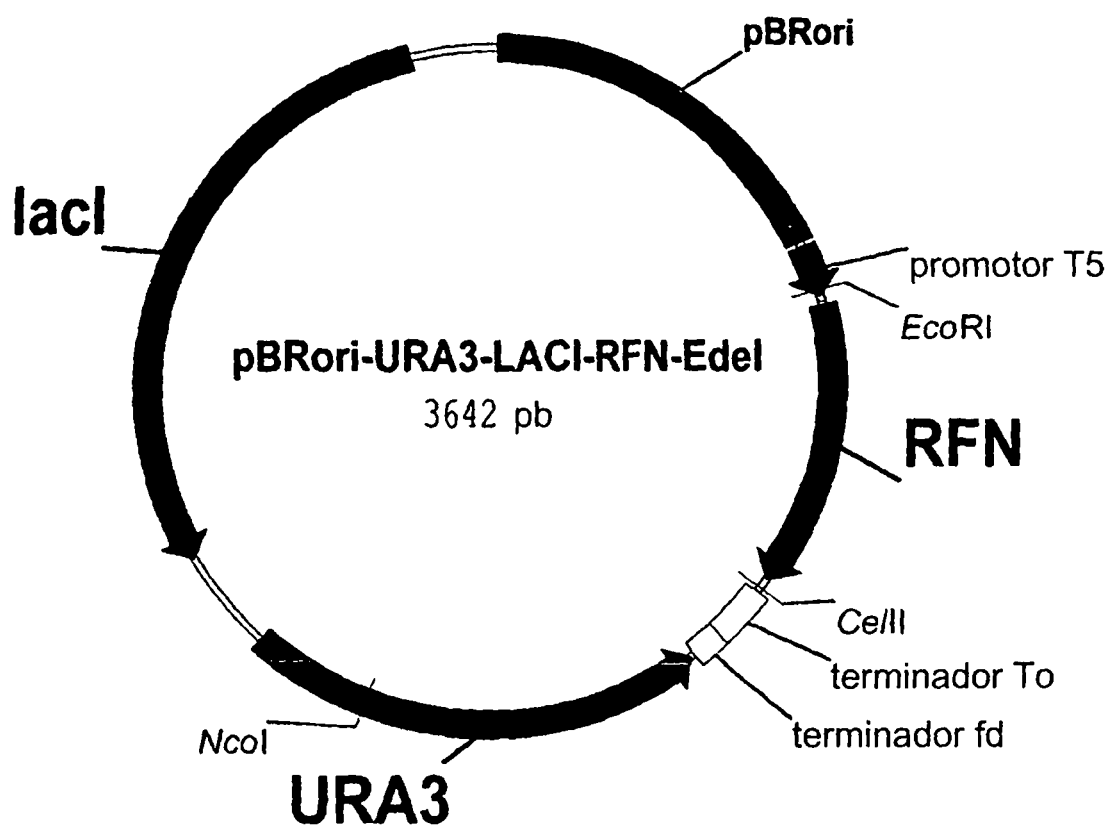
5. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** por el hecho de que el péptido antifusogénico consta de 10 a 100 aminoácidos.

6. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, **caracterizado** por el hecho de que la unidad de repeticiones consta de 2 a 20 secuencias de péptido antifusogénico idénticas.

7. Una preparación de cuerpos de inclusión que contiene un polipéptido de fusión formado por (en dirección de aminoterminal a carboxiterminal)

- a) un péptido antifusogénico en forma de péptido multicopia con una longitud aproximada de 10 a 100 aminoácidos;
- b) un sitio de escisión situado entre los péptidos antifusogénicos.

Fig. 1



ES 2 280 673 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> Métodos para la producción recombinante de péptidos antifusogénicos

<130> 21489 EP1

<140>

<141>

<150> EP02025618.6

<151> 2002-11-19

<150> EP03000988.0

<151> 2003-01-17

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido T1357

<400> 1

Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
1 5 10 15

Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
20 25 30

Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
35

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido T680

<400> 2

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
20 25 30

Trp Asn Trp Phe
35

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 280 673 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido RSV118

<400> 3

```

5      Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
      1          5          10          15

10     Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
      20          25          30

      Lys Ser Thr
      35

```

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido MV257

25 <400> 4

```

      Leu His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp
      1          5          10          15

30     Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys
      20          25          30

      Glu Leu Leu
      35

```

<210> 5

<211> 13

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

45

<400> 5

```

      Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg
      1          5          10
50

```

<210> 6

<211> 13

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

60

<400> 6

```

      Met Ser Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg
      1          5          10
65

```

<210> 7

ES 2 280 673 T3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

 <400> 7
 10 Met Ser Asp Leu Pro Gln Thr His His His His His Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg
 15
 <210> 8
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión
 25
 <400> 8
 Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 30
 <210> 9
 <211> 4
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión
 40
 <400> 9
 Ile Glu Gly Arg
 1
 45
 <210> 10
 <211> 3
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión
 55
 <400> 10
 Gly Pro Arg
 1
 60
 <210> 11
 <211> 8
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 280 673 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión

<400> 11

5 His Pro Phe His Leu Leu Val Tyr
 1 5

<210> 12

10 <211> 35

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador N1

<400> 12

20 aaaaaagcgg ccgcgacaat tcgcgcgcga aggcg 35

<210> 13

25 <211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador N2

<400> 13

35 aaaaaagcgg ccgctcactg cccgctttcc agtcgg 36

40

45

50

55

60

65