



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 044**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00988440 .4**

86 Fecha de presentación : **28.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1255769**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Procedimiento universal para el replegamiento de proteínas recombinantes.**

30 Prioridad: **25.01.2000 US 177836 P**  
**27.01.2000 US 178368 P**  
**08.06.2000 US 210292 P**  
**08.06.2000 US 210306 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es: **Oklahoma Medical Research Foundation**  
**825 N.E. 13th Street**  
**Oklahoma City, Oklahoma 73104, US**

72 Inventor/es: **Lin, Xinli**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

**ES 2 287 044 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento universal para el replegamiento de proteínas recombinantes.

5 **Antecedente de la invención**

La presente invención está generalmente en el campo de los métodos para la manufactura de proteínas recombinantes y especialmente en el campo de replegamiento de proteínas recombinantes expresadas como cuerpos de inclusión en sistemas de expresión procariotas como *E. coli*.

10 La expresión de proteínas recombinantes con actividad biológica natural y la estructura, referida como "Proteómica", se convierte en importante de forma creciente con la terminación de la secuenciación genómica para diversos organismos y la terminación cercana de la secuenciación del genoma humano. Un aspecto de la proteómica es expresar grandes cantidades de proteínas para estudios estructurales y funcionales, tanto como para aplicaciones comerciales.  
15 La menos costosa y más eficiente forma es expresar las proteínas recombinantes en *E. coli*. Las proteínas son expresadas tanto intracelularmente o secretadas en los espacios periplasmáticos. En el caso anterior, las proteínas son a menudo depositadas en cuerpos de inclusión, especialmente si la proteína tiene enlaces disulfuros.

20 Sin embargo, uno de los problemas en expresar proteínas de mamíferos en *E. coli* son que la mayoría de las proteínas expresadas forman cuerpos de inclusión insolubles. Aunque, este problema puede ser evitado usando varios sistemas de expresión de insecto o mamíferos, el crecimiento en *E. coli* es más rápido y menos costoso comparado con los cultivos de mamífero e insectos. Además, algunas proteínas son tóxicas para el hospedero cuando se expresan en sus formas nativas, por lo tanto, la expresión como cuerpos de inclusión insolubles es la única manera de obtener muchas proteínas recombinantes. Es importante: alto niveles de expresión pueden ser alcanzados para la mayoría de las proteínas. 400 a 600 mg de cuerpos de inclusión por litro de cultivo bacteriano pueden ser alcanzados rutinariamente; hasta 9,700 mg/L han sido reportados usando este método (*Jeong KL; Lee SY, 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65:3027-32*). Los cuerpos de inclusión pueden ser fácilmente purificados hasta más que el 90% con una simple congelación/descongelación y un procedimiento de lavado con detergente.

30 Los cuerpos de inclusión aparecen como gránulos citoplasmático densos cuando las células son observadas con un microscopio de luz normal. Normalmente, las células son destruidas por disrupción mecánica de las células, seguidas por la centrifugación durante 30 minutos a 4700 g. Los cuerpos de inclusión sedimentaran a baja fuerzas "g" y pueden ser separadas de otras proteínas intracelulares. La purificación posterior puede ser hecha lavando el precipitado con un tampón usado durante la disrupción de células, o por la centrifugación del precipitado resuspendido en glicerol 40-50%.

Muchas proteínas extracelulares eucariotas contienen enlaces disulfuro. Las proteínas que tienen múltiples enlaces disulfuro pueden formar enlaces disulfuro no naturales durante el replegamiento en forma reducida. Después del replegamiento entonces se bloquea a menos que el enlace disulfuro incorrecto sea cortado por reducción con un -tiol externo o por un ataque desde un -tiol de una proteína. Organismos eucarióticos que secretan proteínas que contienen disulfuro tienen una maquinaria para asegurar la formación del enlace disulfuro correcto. Una desventaja distintiva de la expresión de proteínas recombinantes en procariotas como cuerpos de inclusión son que las proteínas no son obtenidas en su estado natural y no son en la práctica funcionalmente activa. Una variedad de métodos han sido usados para resolubilizar las proteínas y el de replegarse para reformar la proteína activa. La solución de precipitado de la proteína recombinante requiere generalmente el uso de desnaturalizadores como el hidrocloreto de guanidina 7 M o Urea 8 M. La cantidad de agregación puede continuar aumentando con el tiempo si la proteína se mantiene con el denaturalizante ("*Kelley y Winlder*", "*Folding of Eukaryotic Proteins Produced in Escherichia coli*" *Genetic Engineering 12*, 1-19 at p.6 (1990). La eliminación del denaturalizante desde el cuerpo de inclusión solubilizado por diálisis o columnas de desalinización que provocan que la proteína precipite bajo condiciones donde la proteína natural tiene que estar plegada. Una solución de proteína sin replegarse puede también tener una actividad específica muy baja en ensayos biológicos.

Aunque existan muchos reportes de expresión y replegamiento de varias proteínas en *E. coli* como cuerpos de inclusión, una de las falsas ideas en el replegamiento de proteína son que un método de replegamiento único tiene que ser desarrollado para cada proteína individual (ver a *Kelley y Winkler* en pag. 6). Otra falsa idea es que la mayoría de las proteínas mamíferas no pueden ser replegadas de cuerpos de inclusión. (ver: *Rudolph R. and Lilie H., 1996, FASEB J 10:49-56; Lilie H, Schwarz E, Rudolph R 1998. Curr Opin Biotechnol 9:497-501*). Debido a que los trabajos publicados son principalmente historias de "Éxito" en el replegamiento de cuerpos de inclusión en *E. coli*, es imposible entender una idea general sobre qué porcentajes de proteínas mamíferas pueden ser purificadas usando este procedimiento.

65 Probablemente hay más métodos de replegamiento que proteínas plegadas reportadas en la literatura (para revisar, ver: *Rudolph R., Lilie, H. 1996, FASEB J 10:49-56; Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. 1998, Curr Opin. Biotechnol. 9:497-501; Huxtable, et al., Protein Expression and Purification 12:305-314 (1998); Tich, et al., Protein Expression and Purification 4:59-63 (1993)*). Chaperones diferentes, detergentes, y caotrópicos han sido usados para ayudar el replegamiento. Además, pH, la fuerza iónica, la temperatura, la formulación del tampón, y reactivos de oxidación pueden provocar total replegamiento. Sería prohibitivo probar todas estas condiciones para el replegamiento de grandes cantidades de proteínas, como se requiere para estudios en proteómica o genómica estructural.

Un procedimiento simplificado para el plegamiento de la mayor parte de las proteínas son expresadas en sistemas recombinantes, por lo que se necesita especialmente aquellas que forman cuerpos de inclusión en sistemas como *E. coli*.

- 5 Es por tanto un objetivo de la presente invención suministrar un método "Universal" para replegamiento de proteínas, especialmente proteínas recombinantes, especialmente proteínas recombinantes presentes como cuerpos de inclusión en hospederos bacterianos.

### Resumen de la invención

10

Un método universal de replegamiento ha sido desarrollado y demostrado ser efectivo para el replegamiento de una variedad de proteínas muy diferentes expresadas en bacterias como cuerpos de inclusión. Proteínas representativas que pueden ser disueltas y plegadas en la forma biológicamente activa, con la estructura nativa, son mostradas en la Tabla 1. El método tiene dos pasos claves el de desplegarse y luego plegarse las proteínas expresadas en cuerpos de inclusión. El primer paso es elevar el pH de la solución de proteína en presencia de agentes renaturalizantes para pH más grandes que 9, preferentemente 10. La solución de proteína puede ser mantenida en el pH elevado por un período de hasta 24 horas, o el pH se disminuye de inmediato lentamente, en incrementos de 0,2 unidades de pH/24 horas, hasta que la solución alcanza un pH de 8,0, o ambos pasos usados. En la realización preferida, cuerpos de inclusión purificados son disueltos en 8 M de Urea, 0,1 M de Tris 1 mM de glicina, 1 mM de EDTA, 10 mM de beta mercaptoetanol, 10 mM ditioneitol (DTT) 1 mM de glutatión reducido (GSH), 0,1 mM glutatión oxidado (GSSG), pH 10. La absorbancia a 280 nm (OD280) de la solución de proteína es 5,0. Esta solución está rápidamente diluida en 20 volúmenes de base Tris 20 mM. El soluto resultante es ajustado a pH 9,0 con 1 M de HCl y es almacenado en 4°C durante 24 horas. El pH es ajustado a pH 8,8 y la solución se almacena a 4°C durante otras 24 horas. Este proceso se repite hasta que el pH se ajuste a 8,0. Después de las 24 horas a pH 8,0 las proteínas plegadas pueden ser concentradas por ultrafiltración y aplicadas a una columna de gel filtración para la purificación.

### Descripción detallada de la invención

#### *Expresión de proteínas recombinantes*

30

Las proteínas recombinantes son expresadas típicamente en un hospedero apropiado, por ejemplo, un sistema de expresión procariontas como *E. coli* u otro tipo de bacterias, que usan un vector de expresión usual como un plásmido, bacteriófago o ADN ni siquiera descubierto, y la proteína expresada del plásmido o el ADN integrado al cromosoma del hospedero. Las cepas bacterianas apropiadas que están comercialmente disponibles o pueden ser obtenidas desde *American Type Culture Collection*, Rockville, MD. ("ATCC").

35

Los vectores apropiados pueden ser obtenidos de cualquier número de fuentes, incluyendo la ATCC. Éstos necesitan un promotor que asegure que el ADN se exprese en el hospedero, y podrían incluir otras secuencias reguladoras. El vector también podría incluir medios para la detección, como un marcador de resistencia de antibiótico, proteína titulada fluorescente verde, o antígeno titulado para facilitar la purificación de la proteína recombinante.

40

En cuanto el ADN que codifica la proteína para ser purificado se introduce en el hospedero, el hospedero es cultivado bajo las condiciones apropiadas y son obtenidas hasta cantidades suficientes de proteína recombinante.

45

#### *Métodos de purificación de Replegamiento*

En cuanto la proteína ha sido expresada en la cantidad máxima, debe ser separada y purificada del hospedero bacteriano. La proteína es aislada en general destruyendo las células, por ejemplo, resuspendiendo en detergente, añadiendo lisozima, y luego congelando (por ejemplo, células resuspendidas en 20 ml de TN, 1% Tritón™ X-100, adicionando 10 mg de lisozima; y congelando a -20°C toda la noche), se descongela y se añade DNAasa para degradar todo el ADN bacteriano, luego lavando el precipitado resultante con una solución tampón. El precipitado es disuelto luego en una solución apropiada como se explica debajo, para el replegamiento.

50

La proteína aislada es luego plegada. Existen algunos aspectos críticos de un método de replegamiento universal.

55

(i). *Replegamiento a altos pH*. La mayoría de los procedimientos publicados de proteínas plegadas usando agentes caotrópicos reducidos (como urea 8 M) a un pH fisiológico, generalmente pH 7,4 hasta 8,0. Esto usualmente produce grandes cantidades de precipitación y agregación, haciendo el replegamiento imposible o con un rendimiento muy bajo. Ha sido encontrado que algunas proteínas no pueden ser plegadas a pH fisiológico, pero pueden ser plegadas cuando el pH del replegamiento inicial es alto (al menos pH 9,0 aunque a más alto pH, como pH 10, puede ser deseado). Esta estrategia fue motivada inicialmente por el hecho de que el pepsinógeno puede ser desnaturalizado y renaturalizado reversiblemente entre pH 8,0 y 9,0. Se postula que a pH altos (como pH 9,0), las proteínas se pueden obtener en algunas estructuras secundarias, permitiendo que sean plegadas más eficientemente cuando la acidez de la solución de replegamiento se baja al pH biológico. Después fue descubierto que incluso para las proteínas que pueden ser plegadas a un pH fisiológico, a pH altos el replegamiento resultó en un mejor rendimiento. Además el replegamiento a pH alto es un método excelente para prevenir la precipitación inicial a gran escala.

65

## ES 2 287 044 T3

(ii) *concentración de caotrópico no denaturalizante*. Ha sido mostrado en varios laboratorios que concentraciones no renaturalizantes de reactivos caotrópicos, como 0,5 a 1,0 M de urea, hidrocloreto de guanidina, y L-arginina, pueden ser usados para ayudar al replegamiento y estabilizar las proteínas plegadas (*Rudolph et al., FASEB J 10:49-56, 1996*). La concentración preferida de reactivos caotrópicos es 0,4 M, aunque la concentración podría ampliarse de 0 a 4 M. Una concentración moderada de Urea en el procedimiento de purificación por replegamiento no ha sido encontrado que tenga un efecto denaturalizante sobre las proteínas.

(iii) *reactivos de oxidación/reducción*. Los cuerpos de inclusión para proteínas de mamíferos que contienen enlaces disulfuro tienen que ser disueltos en presencia de reactivos reductores. Representantes de agentes reductores incluyen el beta-mercaptoetanol DTT, en un intervalo de 0,1 mM a 100 mM, preferentemente 10 mM; en un intervalo de de 0,1 mM a 10 mM, preferentemente 10 mM; glutatión (GSH), en un intervalo de 0,1 mM a 10 mM, a preferentemente 1 mM; y oxidar glutatión reducido (GSSG), en un intervalo de 0,1 mM a 10 mM, preferentemente 1 mM. El beta mercaptoetanol es el reactivo preferido que se reduce. Además, ditioneitol y/o glutatión oxidado reducido (GSH, GSSG) también pueden ser incluidos para facilitar “Óxidos confusos”, enlaces disulfuro intermedios de plegados equivocados.

(IV) *Control de pH*. Es importante que la solución de proteína se mantenga en una condición lo suficientemente elevada del plegamiento de la proteína. Esto se alcanza preferentemente reduciendo el pH lentamente, en incrementos de 0,2 unidades de pH por 24 horas. En este método, la solución de proteína se ajusta a un pH alto, preferentemente al menos 9,0 o más alto, o al menos 10, preferentemente 11. La proteína se mantiene preferentemente a cada pH durante al menos 24 horas, aunque los efectos comparables pueden ser alcanzados con los períodos de tiempo más breves, por ejemplo, por un período de tres, seis, nueve, doce, dieciocho o veinte horas, las más preferentemente al menos doce horas. El pH puede ser ajustado por la adición de un ácido o por la diálisis o la dilución a un pH inferior. La adición del ácido es preferida.

Las cuatro condiciones discutidas arriba son consideradas los aspectos más esenciales del protocolo básico para el procedimiento de replegamiento “Universal”.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 287 044 T3

TABLA 1

*Expresión, repliegamiento y purificación de diferentes proteínas desde E. coli*

	<b>Nombre</b>	<b>Desde</b>	<b>Organismo</b>	<b>Plegada</b>	<b>Purificación</b>	<b>Ref,</b>
5	Pepsinogeno	Longitud completa	Porcina	Si	Si	Lin y col. 1989
10	Pepsinogeno	Dominio N, C	Porcina	Si	Si	Lin y col. 1992
	Rizopus	Longitud completa	Hongos	Si	Si	Lin y col. 1993
15	Pepsinogeno	Longitud completa	Archae	No	No	Ninguna
	Termopsina	Fusión	Archae	Yes	Parcial	Li, Liu Tang, 92
20	Catepsina D	Longitud completa	Humano	No	No	Ninguna. Bajo rend.
	Embarazo	Longitud completa	Bovino	No	No	Ninguna
25	Ant. específica		Ovino	Si	Si	Lin y col., 1995
	HIV proteasa	Longitud completa	HIV	Si	Si	Ermolief y col., 1997
30	SAP	Longitud completa	levadura	Si	Si	Lin y col., 1993. Koelsch col.,98
35	Estreptoquinasa	Longitud completa	Bacteria	Si	Si	Wang y col., 1998
	Plasminogeno	Dominio gato	Humano	Si	Si	Wang y col., 2000
40	Cadosina A	Longitud completa	Planta	Si	Si	Faro y col., 1999
	Napsina 1	Longitud completa	Humano	No	No	Koelsch y col., 2000
45	Memapsina 2	Longitud completa	Humano	Si	Si	Lin y col., 2000
50	Memapsina 1	Longitud completa	Humano	Si	Si	
	Pre S	Parcial	HBV	Si	Si	
55	Unc-76	Longitud completa	C. elegans	Si	Si	
	Oc-1	Longitud completa	C. elegans	Si	Si	
60	Ceh-10	Longitud completa	C. elegans	Si	Si	
	Ppp-1	Longitud completa	C. elegans	No	No	
65						

## Referencias para la Tabla 1

- 5 **Lin, X, Wong, R.N.S., and Tang, J. (1989)** “Synthesis, purification, and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen”. *J. Biol. Chem.* **264**:4482-4489.
- Lin, X.L., Lin, Y.-Z., Koelsch, G., Gustchina, A., Wlodawer, A., and Tang, J. (1992)** “Enzymic activities of two-chain pepsinogen, two-chain pepsin, and the amino-terminal lobe of pepsinogen”. *J. Biol. Chem.* **267**:17257-17263.
- 10 **Lin X., Loy, J.A., Sussman, F., and Tang, J. (1993)** “Conformational instability of the N- and C-terminal lobes of porcine pepsin in neutral and alkaline solutions”, *Pro. Sci.* **2**:1383-1390.
- Chen, Z., Koelsch, G., Han, H.-P., Wang, X.-J., Lin, X., Hartsuck, J.A., and Tang, J. (1991)** “Recombinant rhizopuspepsinogen”, *J. Biol. Chem.* **266**:11718-11725.
- 15 **Lin, Y.-Z., Fusek, M., Lin, X.L., Hartsuck, J.A., Kezdy, F.J., and Tang, J.(1992)** “pH Dependence of kinetic parameters of pepsin, rhizopuspepsin, and their active-site hydrogen bond mutants”. *J. Biol. Chem.* **267**:18413-18418.
- Lin, X.L., Liu, M.T., and Tang, J. (1992)** “Heterologous expression of thermopsin, a heat stable acid proteinase”. *Enzyme Microb. Technol.* **14**:696-701.
- 20 **Lin, Y.-Z., Lin, X., Hong, L., Foundling, S., Heinrikson, R.L., Thaisrivongs, S., Leelamanit, W., Raterman, D., Shah, M., Dunn, B.M., and Tang, J. (1995)** “Effect of point mutations on the kinetics and the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 protease: relationship to drug resistance”. *Biochemistry* **34**:1143-1152.
- 25 **Ermolieff, J., Lin, X., and Tang, J. (1997)** Kinetic properties of saquinavir-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 protease and their implications in drug resistance *in vivo*. *Biochemistry* **36**:12364-12370.
- Lin, X., Tang, J., Koelsch, G., Monod, M., and Foundling, S. (1993)** “Recombinant candiditropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*”. *J. Biol. Chem.* **268**, 20143-20147.
- 30 **Koelsch, G., Tang, J., Monod, M., Foundling, S.I., Lin, X. (1998)** “Primary substrate specificities of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*”. *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**:335-338.
- Wang, X., Lin, X., Lowy, J.A., Tang, J., Zhang, X.C. (1998)** “Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase”, *Science.* **281**:1662-1665.
- 35 **Wang, X., Terzyan, S., Tang, J., Loy, J., Lin, X., and Zhang, X. (2000)** “Human plasminogen catalytic domain undergoes a novel conformational change upon activation” *J. Mol. Biol.* (in press).
- 40 **Faro, C., Ramalho- Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simoes, I., Andrade, R., Verissimo, P., Lin, X., Tang, J., Pires, E. (1999)** “Cloning and Characterization of cDNA Encoding Cardosin A, an RGD-containing Plant Aspartic Proteinase”, *J. Biol. Chem.* **274** (40):28724-28729.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000)** “Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the secretase site of amyloid precursor protein”. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **97**(4):1456-1460.
- 45 **Ghosh, A.K., Shin, D., Downs, D., Koelsch, G., Lin, X., Ermolieff, J., Tang, J. (2000)** “Design of potent inhibitors form human brain memapsin 2 (-secretase)” *J. Amer. Chem. Soc.*, **122**:3522-3523.
- 50 La presente invención será comprendida por referencia posterior a los siguientes ejemplos.

## Ejemplo 1

55 *Método preferido para Replegamiento Proteínas Recombinantes*A. *Reactivos*

60 Medio ZB: 10 g N-Z Amina A, 5 g NaCl/L

Medio LB: 10 g Triptona, 5 g extracto de levadura de g, 10 g NaCl/L, pH 7,5

Urea 8 M: 8 M urea, 0,1 M de TRIS™, 1 mM glicina, 1 mM EDTA, pH 10

65 Tampón TN: 0,05 mM TRISTM, 0,15 M NaCl, pH 7,5.

## ES 2 287 044 T3

### B. Expresión de la proteína recombinante

1. La expresión de plásmidos debe ser transfectada a un hospedero apropiado, como la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y depositada sobre placas ZB Ampicilina, que selecciona los organismos recombinantes deseados. Una colonia sola de cada construcción es inoculada en 100 ml de medio ZB ampicilina y 16 h crecidas a 37°C.
2. Inocular 20 ml del cultivo toda la noche en 1 L/LB ampicilina, y agitado a 37°C hasta que la OD<sub>600</sub> llega a 0,4-0,6. Añada IPTG a 0,5 mM, y luego se agita 3 h.
3. Centrifugar y resuspender las células en 20 ml de TN/1% Triton™ X-100. Añade 10 mg de lisozima y congele a -20°C toda la noche.
4. Descongele las células congeladas, añada 20 µl 1M MgSO<sub>4</sub>, 100 µg DNAasa, y agitar hasta que el ADN bacteriano se disuelva totalmente.
5. Añada 250 ml de TN/1% Triton™ X-100 y agitado por 2-4 horas. Centrifugue y repita el lavado con Triton una vez más.
6. Disuelva el precipitado en 10 ml de solución de urea 8 M, añada beta-Mercaptoetanol a 100 mM. Esta solución puede ser ultracentrifugada, y está luego lista para el replegamiento.

### C. Replegamiento y purificación

1. La OD<sub>280</sub> de la solución que contiene los cuerpos de inclusión se ajustan a 5,0 con la solución de urea 8 M. La solución definitiva contiene los siguientes reactivos reductores:

10 mM beta-Mercaptoetanol

10 mM (Ditiotreitol) DTT

1 mM glutatión reducido (GSH)

0,1 mM glutatión oxidado (GSSG)

El pH final de la solución es 10,0.

1. La solución de más arriba es rápidamente diluida en 20 volúmenes de 20 mM de TRIS™, el pH es ajustado a 9,0, y luego ajustado a 8,0 lentamente con HCl 1 M, ajustando pH a 8,8 durante las veinticuatro horas, luego 8,6 durante veinticuatro horas, etc, hasta que el pH es 8,0. Por otra parte, las proteínas pueden ser plegadas usando diálisis. El OD<sub>280</sub> de la solución de urea de 8 M es ajustado a 0,5, y se hace diálisis contra 20 volúmenes de base TRIS™. El pH de la solución es otra vez ajustado a 8,0 lentamente.
2. El material plegado se concentra por ultrafiltración luego, y separado por gel filtración, por ejemplo, sobre una columna de SEPHACRYL™-300, la columna se equilibra con 20 mM de TRIS™, HCl, 0,4 M de urea, pH 8,0.
3. Las fracciones de S-300 pueden ser verificada por corridas en SDS-PAGE no reducidas. La proteína plegada equivocadamente corre a un peso molecular muy alto, mientras que las proteínas plegadas corren a un peso molecular normal.
4. El pico plegado desde la columna S-300 puede ser purificado posteriormente en columnas FPLC Resource-Q™ ó Resource-S™, es equilibrada con 20 mM TRIS-HCl (el tampón HEPES por Resource-S™), 0,4 M de urea, pH 8,0. La enzima es eluida de la columna con un gradiente lineal de NaCl.

1. La Tabla I pone en una lista todas las proteínas que han sido plegadas directamente o como cuerpos de inclusión.

#### Ejemplo 2

#### Expresión y Replegamiento de memapsina 2

1. Pro-memapsina 2 son PCR amplificado y clonados en el sitio de BamHI de un vector pET11a. El vector resultante expresa pro-memapsina 2 que tiene una secuencia desde Ala-8p hasta Ala 326. Dos vectores de expresión se construyen, pET11-memapsina 2-T1 (en lo sucesivo T1) y pET11-memapsina 2-T2 (en lo sucesivo T2). En ambos vectores, los 15 residuos del N-terminal de las proteínas recombinantes expresadas son obtenidos del vector de expresión. Residuos Pro-memapsina-2 comienza en el residuo Ala-16. Las dos pro-memapsina-2s tienen diferente longitudes en el C-terminal. Clones extremo T1 a Thr-454 y clon extremo T2 Ala-419. La constructor T1 contiene una extensión del C-terminal desde la construcción T2 pero no expresa cualquier dominio de transmembranas pronosticado.

## ES 2 287 044 T3

Los vectores de expresión T1 y T2 son por separado transfectados en cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los procedimientos para el cultivo de bacterias transfectadas, la inducción por la síntesis de proteínas recombinantes y la recuperación y lavado de los cuerpos de inclusión que contienen proteínas recombinantes que son esencialmente descritas por Lin et al., 1994 *Methods in Enzymology* **214**, 195-224. Básicamente, los cuerpos inclusión son lavados con 1% (v/v) Triton X-100 y 0,15 M NaCl en 0,1 M de Tris<sup>TM</sup>-HCl, pH 7,4 la proteína insoluble se disuelve en una solución conteniendo urea 8 M, 0,05 M del ácido de ciclohexil-amino-propano-sulfónico 2,10 mM-mercaptoetanol DTT, 10 mM (Ditiotreitol), 1 mM glutatión reducido (GSH), 0,1 mM glutatión a pH 5,0, para una concentración de proteína de aproximadamente 5 mg/ml. Esta solución es adicionada por goteo 20 volúmenes de base 20 mM Tris agitado rápidamente. El pH de la solución diluida es ajustado hasta 9,0 con HCl 1 M y mantenido a 4°C durante 24 horas. El pH es ajustado a 8,8 con HCl 1 M, y mantenida a 4°C otra vez durante 24 horas. El proceso es repetido hasta que el pH se ajusta a 8,0. Tres métodos de replegamiento diferentes han producidos resultados satisfactorios.

### (i) Método de dilución rápido

Pro-memapsina 2 en 8M de urea/10 mM DTT (Ditiotreitol), 1 mM glutatión reducido (GSH), 0,1 mM glutatión oxidado (GSSG), con OD<sub>280 nm</sub> = 5 fue rápidamente diluida en 20 volúmenes de 20 mM base de Tris. La solución fue ajustada lentamente a pH 8 con HCl 1 M. La solución de replegamiento fue mantenida luego a 4°C durante 24 a 48 horas antes de proceder con la purificación.

### (ii) Método de diálisis reversa

Un volumen igual de 20 mM de TRIS<sup>TM</sup>, 0,5 mM que oxidado/1,25 mM glutatión reducido, pH 9,0 es añadido a pro-memapsina 2 agitado rápidamente en 8 M de urea de 10 mM beta-mercaptoetanol con OD<sub>280 nm</sub> = 5. El proceso es repetido tres veces más con intervalos de 1 hora. La solución resultante es luego dializado contra volumen suficiente 20 mM de base TRIS<sup>TM</sup> y luego con el propósito de que la concentración de urea final sea de 0,4 M. El pH de la solución es luego ajustada a pH 8,0 lentamente con HCl 1M.

### (iii) Método preferido para replegamiento

Los cuerpos de inclusión son disueltos en urea 8 M, 0,1 M de TRIS<sup>TM</sup>, 1 mM Glicina, 1 mM EDTA, 100 mM beta-mercaptoetanol, pH 10,0. El OD<sub>280</sub> de los cuerpos de inclusión se ajusta hasta 5,0 con la solución de urea 8 M sin beta-mercaptoetanol. La solución definitiva contiene los siguientes reactivos reductores: 10 mM beta-mercaptoetanol, 10 mM DTT (Ditiotreitol), 1 mM glutatión reducido, y 0,1 M glutatión oxidado. El pH final de la solución es 10,0.

La solución anterior es rápidamente diluida en 20 volúmenes de base 20 mM TRIS<sup>TM</sup>, el pH se ajusta a 9,0, y la solución resultante es mantenida a 4°C por 16 horas. La solución es equilibrada a la temperatura ambiente en 6 horas, y el pH es ajustado a 8,5. La solución es retornada a 4°C otra vez durante 18 horas.

La solución es equilibrada otra vez a la temperatura ambiente en 6 horas, y el pH es ajustado a 8,0. La solución es retornada a 4°C otra vez durante 4 a 7 días.

### Purificación del Pro-memapsina 2-T1 recombinante

El material replegado es concentrado por ultrafiltración, y separado en una columna SEPHACRYL<sup>TM</sup> S-300, equilibrada con 20 mM TRIS<sup>TM</sup> HCl, 0,4 M de urea, pH 8,0. El pico replegado (segundo pico) desde la columna S-300 puede ser purificado posteriormente con una columna FPLC RESOURCE-Q<sup>TM</sup>, el que es equilibrado con 20 mM TRIS<sup>TM</sup>-HCl, 0,4 M de urea, pH 8,0. La enzima es eluida de la columna con un gradiente lineal de NaCl. El pico replegado desde S-300 también puede ser activado antes de la purificación posterior. Para la activación, las fracciones son mezcladas con igual volumen de 0,2 M de acetato de sodio, 70% de glicerina pH 4,0. La mezcla es incubada a 22°C durante 18 horas, y luego se hace diálisis dos veces contra 20 volúmenes de 20 mM Bis-TRIS<sup>TM</sup>, 0,4 M de urea, pH 6,0. Los materiales dializados son luego purificados posteriormente sobre una columna FPLC-RESOURCE-Q<sup>TM</sup> equilibrada con 20 Bis TRIS<sup>TM</sup>, 0,4 M de urea, pH 6,0. La enzima es eluida con un gradiente lineal de NaCl.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el replegamiento de proteínas que consta de:

5 Mantener la proteína recombinante a pH 9,0 o mayor, en presencia de uno o más agentes reductores y caotrópicos, se reduce el pH de la solución gradualmente durante un período de al menos 24 horas hasta pH 8,0 para inducir la renaturalización de al menos una parte de la proteína que se exhibe cualitativamente y que presenta una actividad biológica y la característica estructural de la proteína.

10 2. El método de la Reivindicación 1, en el que el pH se disminuye en incrementos equivalentes a 0,2 unidades de pH por 24 horas.

15 3. El método de la Reivindicación 1, en el que la proteína se mantiene a un pH mayor que 9,0 por un período de al menos 24 horas.

4. El método de la Reivindicación 1, en el que el pH se disminuye por adición de ácido.

20 5. El método de la Reivindicación 1, en el que el pH se disminuye por dilución o diálisis a una solución a pH inferior.

6. El método de la Reivindicación 1, en el que los agentes reductores y caotrópicos son seleccionados entre el grupo que comprende entre 0,4 y 1,0 M de urea, 0,1 mM hasta 100 mM de beta-mercaptoetanol, 0,1 mM hasta 100 mM de DTT, 0,1 mM a 10 mM de glutatión reducido, y 0,1 mM a 10 mM de glutatión oxidado.

25 7. El método de la Reivindicación 1, en el que la proteína se extrae primero a partir de cuerpos de inclusión bacterianos.

8. El método de la Reivindicación 7, en el que la bacteria es *E. coli*.

30 9. El método de la Reivindicación 7, en el que los cuerpos de inclusión se disuelven hasta un pH final entre 9 y 10.

10. El método de la Reivindicación 1, en el que la proteína se disuelve a un pH por encima de 10,0.

35 11. El método de Reivindicación 1, en el que la proteína se disuelve a un pH por encima de 11,0.

12. El método de la Reivindicación 1, en el que la proteína se disuelve a un pH por encima de 12,0.

13. El método de la Reivindicación 1, en el que el pH se disminuye durante un período de al menos 36 horas.

40 14. El método de Reivindicación 1, en el que el pH de la solución se reduce más rápidamente a pH más alto, y más gradualmente al acercarse al intervalo del pH fisiológico de la proteína.

45 15. El método de la Reivindicación 1 que consta de el paso adicional para separar especies de proteínas, las que presentan actividad biológica de especies de proteínas inactivas, o replegadas incorrectamente.

50

55

60

65