



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 357 888**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

**C07K 1/113** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02774777 .3**

⑯ Fecha de presentación : **12.11.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1453858**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

⑭ Título: **Procedimiento para renaturalización de proteínas recombinantes que contienen disulfuro a altas concentraciones proteicas en presencia de aminas.**

⑩ Prioridad: **22.11.2001 EP 01127373**

⑬ Titular/es: **BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13353 Berlin, DE**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOP: **03.05.2011**

⑭ Inventor/es: **Peters, Jörg y Minuth, Torsten**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **03.05.2011**

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

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 para renaturalización de proteínas que contienen disulfuro, recombinantes, a altas concentraciones proteicas en presencia de aminas

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la renaturalización de proteínas eucarióticas, recombinantes, que contienen enlaces disulfuro después de expresión en procariotas.

**Antecedentes y técnica anterior**

En el caso de la producción de proteínas recombinantes en sistemas de expresión heterólogos como por ejemplo *Escherichia coli*, estas proteínas a menudo forman agregados insolubles, inactivos (denominados "cuerpos retractiles" o "cuerpos de inclusión"). Adicionalmente, estos cuerpos de inclusión están contaminados por componentes de las células huésped como proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas y contaminantes de peso molecular bajo de las células huésped. Se asume que la formación de estos cuerpos de inclusión es un resultado de la concentración local muy alta de la proteína heteróloga en la célula durante la inducción y biosíntesis de proteínas. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína heteróloga en cuestión es también de gran importancia así como la presencia de residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro covalentes durante el replegamiento oxidativo. Antes de que estas proteínas objetivo se puedan usar, por ejemplo, para propósitos terapéuticos, los cuerpos de inclusión han de purificarse y, posteriormente, la estructura tridimensional tiene que estar renaturalizada para convertir la proteína a la conformación biológicamente activa.

20 Una secuencia comúnmente aplicada de etapas de procedimiento implica, primero, la solubilización de los cuerpos de inclusión mediante la adición de altas concentraciones de agentes desnaturalizantes caotrópicos (por ejemplo clorhidrato de guanidinio o urea), o mediante la adición de agentes fuertemente ácidos como, por ejemplo, mezclas de glicina/ácido fosfórico. De forma concurrente, los enlaces disulfuro intramoleculares presentes en los cuerpos de inclusión puede bien reducirse químicamente o bien escindirse mediante el así llamado procedimiento de sulfitolisis que involucra sulfito y un agente oxidante. En segundo lugar, la mezcla de proteína solubilizada puede purificarse 25 adicionalmente bien por medios cromatográficos o bien por procedimientos de filtración, ambos de los cuales son procedimientos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica.

30 Subsiguientemente, la solución de proteína monomérica linealizada en presencia de altas concentraciones de agente caotrópico se diluye altamente con el fin de tener en cuenta la formación de la forma biológicamente activa. Esto se puede llevar a cabo bien rápidamente (mediante dilución simple en un gran volumen de tampón de replegamiento) o bien lentamente por diafiltración o por diálisis frente al tampón de replegamiento. Otras técnicas descritas en la bibliografía implican la adsorción de la proteína objetivo en una resina cromatográfica y posteriormente, implican disminuir la concentración de agente caotrópico permitiendo que el replegamiento tenga lugar, o que tenga lugar cromatografía de exclusión por tamaño con el fin de separar las cadenas de la proteína eludiendo de este modo la tendencia a formar agregados. En cada caso, la concentración de la sal caotrópica tiene que disminuirse por debajo de 35 un cierto límite, que es dependiente de la proteína objetivo, por ejemplo usualmente por debajo de clorhidrato de guanidinio 0,5 M.

D2 describe un procedimiento para la purificación de interleucina-4 humana expresada en *E. coli* que comprende la etapa de replegar la proteína desnaturalizada diluyendo su solución en un tampón de TRIS que comprende adicionalmente glutation.

40 La reacción secundaria principal durante el replegamiento es la formación de agregados insolubles, que es dependiente de la concentración local de intermedios de plegamiento. En la bibliografía, se describe un amplio intervalo de coadyuvantes de plegamiento, que suprime de forma efectiva esta formación de agregados de proteínas insolubles, como por ejemplo proteínas chaperonas, otros tipos de proteínas (por ejemplo seroalbúmina bovina), y varios tipos de materiales no proteicos, incluyendo azúcares y azúcares cíclicos, alcoholes de cadena corta como por ejemplo glicerol, 45 pentanol, hexanol, sustratos enzimáticos, polímeros sintéticos, detergentes y sales caotrópicas (de Bemárdez Clark, E (1998): Curr. Opinion Biotechnol. 9: 157-163 y citas en el mismo; Li Lie H, Schwarz E, Rudolph R (1998): Curr. Opinion Biotechnol. 9:947-501 y citas en el mismo; Sharma A, Karuppiah N (1998): patente de los Estados Unidos 5,728,804 presentada el 2 de junio de 1995). Aún otra aproximación se ha publicado recientemente donde los así llamados chaperones artificiales se usan para mantener intermedios de plegamiento hidrófobo en solución (Gellman S, Rozema DB (1996): patente de los Estados Unidos 5,563,057 presentada el 31 de octubre de 1994). En una primera etapa, los intermedios de plegamiento hidrófobos están atrapados en micelas detergentes conduciendo a una supresión de agregación de proteínas. Los intermedios de plegamiento atrapados no pueden a veces plegarse a la conformación nativa. En una segunda etapa, un "agente retirador", como por ejemplo diferentes ciclodextrinas o dextrinas lineales, se añaden en exceso molar considerable al eliminar el detergente dejando que la proteína se repliegue en su conformación 50 biológicamente activa. Existen varias desventajas para este enfoque como 1. Gran exceso molar del caro "agente retirador", 2. Agregación proteica que tiene lugar durante la fase "retiradora", 3. Dificultad para eliminar detergente residual unido a la proteína diana, 4. Limitaciones en capacidad proteica y solubilidad de ciclodextrinas y 5. Sensibilidad 55 del sistema de chaperonas artificial con respecto a variaciones en el procedimiento (solidez limitada). Además, los

sistemas de chaperonas artificiales son específicos con respecto a la proteína objetivo, el tipo de detergente y el "agente retirador" y las condiciones experimentales empleadas. Por lo tanto, no hay sistema de chaperonas artificial genérico disponible (Daugherty DL, Rozema D, Hanson PE, Gellman SH (1998): J. Biol. Chem. 273: 33961-33971; Rozema D, Gellman SH (1996): J. Biol. Chem. 271: 3478-3487).

- 5 La mayoría de los supresores de agregación mencionados sólo trabajan con un número limitado de proteínas. Una excepción es el aminoácido L-arginina, que se muestra para ser generalmente aplicable a un amplio intervalo de proteínas diferentes como por ejemplo t-PA, fragmentos Fab, lisozima y otras enzimas (Rudolph R, Fischer S, Mattes R (1997): Process for the activating of gene-technologically produced, heterologous, disulfide bridge-containing eukaryotic proteins after expression in prokaryotes. Patente de los Estados Unidos 5,593,865; Rudolph R, Fischer S, Mattes R (1995): 10 Process for the activation of T-PA or ING after genetic expression in prokaryotes. Patente de los Estados Unidos 5,453,363; de Bernárdez Clark, E (1998): Curr. Opinion Biotechnol. 9: 157-163 y citas en éstas).

15 L-arginina estuvo mostrando ser efectiva para un número de proteínas sólo en alto exceso molar con respecto a la molaridad de la proteína a replegarse. El mecanismo por el que L-arginina suprime la formación de agregados de proteína aún es desconocido (Lilie H y col.(1998): Curr. Opinion Biotechnol. 9: 497-501). Además, L-arginina es un producto químico bueno quirral, caro.

Así, existe todavía una necesidad de desarrollar estrategias para replegamiento de proteínas usando técnicas convencionales. A partir del estado de la técnica, no se conoce ningún supresor de agregación químicamente simple y barato generalmente utilizable, que se pueda aplicar en un procedimiento de replegamiento de proteínas comercialmente atractivo a concentraciones altas de hasta 0,5-1 g/l.

## 20 Sumario de la invención

Comenzando a partir de agregados de proteína insoluble (denominados cuerpos de inclusión) según se obtienen por sobreexpresión en *Escherichia coli*, es la tarea de la presente invención hacer disponible una vía comercialmente atractiva para la renaturalización de proteínas, es decir Interleucina-4 y sus derivados, a altas concentraciones proteicas empleando un supresor de agregación adecuado, químicamente simple y fácilmente disponible. Debido a su 25 inespecificidad, el/los supresor(es) de agregación como se describen en la presente invención se pueden aplicar a un amplio intervalo de proteínas diferentes.

El procedimiento descrito en el presente documento comprende añadir una solución de proteínas desnaturalizadas, modificadas químicamente o de proteínas reducidas, en un tampón de replegamiento que contiene L-Cisteína y TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o trietanolamina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

30 En una realización preferida, el tampón de replegamiento contiene otro potenciador como, por ejemplo iones adicionales, como por ejemplo cloruro, que ayudan en suprimir la formación de agregados de proteína sinérgicamente.

Se sabe para un gran número de proteínas de la técnica anterior que, para renaturalización, ciertos valores limitantes de concentración de proteína no deben excederse. El nivel de estos límites de concentración es dependiente de la 35 naturaleza de la proteína a volver a plegar. Ahora está el reconocimiento de que cantidades comparativamente grandes de proteínas desnaturalizadas no requieren cantidades más grandes de volumen en solución con el fin de lograr cantidades más grandes de proteína replegada debido a la capacidad de solubilización excesivamente alta capacidad de la(s) amina(s) anteriormente mencionada(s) o una combinación de las aminas anteriormente mencionadas y otro potenciador de solubilidad.

El objetivo de la presente invención por lo tanto incluye proporcionar:

- 40 a) un procedimiento del tipo anterior según se define en la reivindicación 1 adjunta para replegar la proteína inactiva dentro de una conformación nativa suprimiendo de forma efectiva por lo tanto la formación de agregados de proteína causando pérdida de rendimiento de replegamiento y recuperación de proteína soluble;
- b) un procedimiento del tipo anterior según se define en la reivindicación 1 adjunta que permite el replegamiento a altas concentraciones de proteínas; y
- 45 c) un procedimiento del tipo anterior según se define en la reivindicación 1 que se puede usar con productos químicos de materias primas no quirales baratos.

## Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "derivado de interleucina-4" se refiere a mutéinas de Interleucina-4 humana con residuos de aminoácidos intercambiados en sitios diferentes en la cadena polipeptídica de acuerdo con 50 Sebald, W (1992):Patente de los Estados Unidos 5,723,118 y Patente EP 613499B1 fechada el 13 de noviembre de 1992 y Domingues y col. (1999): solicitud de patente de PCT/IB00/00769.

Como se usa en el presente documento, el término BPTI se refiere a inhibidor de tripsina pancreática bovina (también llamada aprotinina).

Como se usa en el presente documento, "proteína plegada correctamente" se refiere a la proteína objetivo en su estructura nativa exhibiendo el enlace disulfuro nativo.

El "rendimiento de replegado", como se usa en el presente documento, se define como la concentración de proteína plegada correctamente, proteína objetivo no modificada (por ejemplo, [mg/l]) en la mezcla de renaturalización.

5 El "rendimiento de replegamiento general", como se usa en el presente documento, se define como la concentración de proteína objetivo no modificada plegada correctamente (por ejemplo, [mg/l]) dividida por la cantidad de la proteína total en la mezcla de renaturalización. El rendimiento de replegamiento general se expresa en [%].

Las expresiones "recuperación de proteína" o "recuperación de proteína soluble", como se usan en el presente documento, se refieren a la proporción de proteína soluble recuperada después de replegamiento y a la proteína total 10 inicial. La recuperación de proteína se expresa en [%].

El término "pureza" ([%]), tal como se usa en el presente documento, se calcula sobre la base del rendimiento de replegamiento de la proteína objetivo y de la concentración de proteína soluble en la mezcla de renaturalización como se determina por RP-HPLC (véase el ejemplo 1).

15 El término TRIS, como se usa en el presente documento, se refiere a la sustancia tamponadora básica tris(hidroximetil)-aminometano. El término TEA, como se usa en el presente documento, se refiere a la sustancia tamponadora básica trietanolamina. El término GndHCl, como se usa en el presente documento, se refiere a la sal caotrópica clorhidrato de guanidino.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 El sujeto de la presente invención es un procedimiento para la reactivación de proteínas con puentes disulfuro recombinantes, después de expresión heteróloga en procariotas que conduce a cuerpos de inclusión insolubles, que son, después de purificación de estos agregados de proteínas, desnaturadas en altas concentraciones de una sal caotrópica adecuada, modificadas químicamente (formación de un disulfuro mixto entre grupos proteína-SH y un mercaptano adecuado o introducción de un grupo sulfito dentro de los grupos proteína-SH para formar grupos S-SO<sub>3</sub>), y renaturalizadas en el tampón de renaturalización, como por ejemplo cloruro, eficaces en evitar agregación de 25 proteínas.

La producción de derivado de Interleucina-4 recombinante que emplea organismo huésped *Escherichia coli* ya se ha descrito en detalle (Apeler H, Wehlmann H (1999) Plasmids, their construction and their use in the manufacture of Interleukin-4 and Interleukin-4 muteins. Documento EP 10 22 339, 26-7-2000).

30 Procedimientos para recogida celular, ruptura celular, purificación de cuerpos de inclusión, solubilización y modificación de grupos químicos SH-se conocen bien por aquellas personas expertas en la técnica (Creighton TE (ed.) (1989): Protein Structure - A Practical Approach. IRL Press, Oxford, Nueva York, Tokio).

35 De la técnica anterior se conoce bien que los agentes químicos de bajo peso molecular pueden suprimir la formación de agregados durante el replegamiento. Por lo tanto, se rastreó un amplio intervalo de productos químicos con el fin de encontrar un supresor de agregación adecuado para emplearse en el procedimiento de replegamiento de derivado de Interleucina-4, pero también otras proteínas como, por ejemplo, BPTI.

40 Como se indica en el ejemplo 1 (**Tabla 1**), un número de productos químicos ayuda de forma efectiva en la solubilización de intermedios de plegamiento que dan como resultado un incremento significativo de la recuperación de la proteína soluble. Sin embargo, esto no significa necesariamente que estos compuestos provoquen también un incremento significativo en rendimiento de isoformas de disulfuro biológicamente activas plegadas correctamente (véase 45 columna "rendimiento de replegamiento relativo" en la **Tabla 1**). Por ejemplo, el detergente cloruro de trietilamonio cetílico (CTAC) solubiliza de forma efectiva intermedios de plegamiento, conduciendo a un incremento en el rendimiento de proteínas del 735% comparado con el control fosfato. Sin embargo, CTAC falla en incrementar el rendimiento de isoformas disulfuro plegadas correctamente dando como resultado un rendimiento de replegamiento bajo y una pureza baja. Varios agentes enumerados en la Tabla 1 se conocen bien de la técnica anterior por su capacidad para ayudar 50 como supresores de agregación durante el replegamiento, como por ejemplo L-Arginina, Urea, clorhidrato de guanidio, poli(etileno)glicoles, acetamida y alcoholes de cadena corta. Sin embargo, la mayoría de estos fallaron en caso de derivado de Interleucina 4 con la excepción de L-arginina y, en un menor grado, clorhidrato de guanidino.

55 El clorhidrato de guanidio solubiliza de forma eficaz intermedios de plegado de manera efectiva a concentraciones óptimas de 750 mM. Los derivados N-metilado o N-etilado y bis(-1-aminoguanidino)-sulfato son intermedios de plegamiento más eficazmente solubilizantes a concentraciones más bajas (200-600 mM) en comparación con clorhidrato de guanidino. Sin embargo, la pureza de la proteína replegada (18,4 a 27,1%) es mucho más baja en comparación con el fosfato control.

Sorprendentemente, el agente tampón Tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS) en la combinación con ácido sulfúrico a altas concentraciones afectó positivamente la solubilización de intermedios de plegamiento (850%) y el rendimiento de 55 replegamiento (677%) mientras que la pureza comparada con el control fosfato disminuye moderadamente. TRIS se

usa ampliamente a concentraciones muy bajas (< 0,1 M) como una sustancia tamponante en mezclas de replegamiento, pero no a altas concentraciones como supresor de agregación. Etanolamina, que está relacionada estructuralmente con TRIS, también afectó positivamente la solubilización de intermedios de plegamiento (pH-valoración con HCl), dando como resultado replegamientos comparables y rendimientos de proteínas y purezas de proteínas comparables. La comparación de TRIS con ácido sulfúrico tritiado frente a ácido clorhídrico muestra el efecto adicional positivo de iones de sulfato en el rendimiento de proteínas, el rendimiento de replegamiento y la pureza. Sin embargo, la etanolamina valorada con ácido sulfúrico no dio como resultado efectos sinérgicos en el replegamiento y en el rendimiento de las proteínas.

Por ejemplo, derivado de Interleucina-4 y BPTI, como se muestra en los **ejemplos 4 y 6**, se pueden replegar de forma efectiva en un sistema de tamponación combinado constituido por TRIS e iones de sulfato (valoración de ácido sulfúrico). En caso de derivado de Interleucina-4, se puede emplear concentraciones proteicas de preferentemente 250 a 1000 [mg/l], más preferentemente de 400 a 700 [mg/l] e, incluso más preferentemente, 450 a 550 [mg/l]. L-cisteína debería estar incluida en la mezcla de replegamiento con el fin de permitir la formación de enlaces disulfuro estabilizadores, preferentemente a 1 a 4 [mM], más preferentemente al 2,5 a 3,5 [mM]. TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> debería estar presente preferentemente a 1 a 3 [M], más preferentemente a 1,4 a 2,4 [M]. El pH del tampón se ajusta a aproximadamente 7-9, más preferentemente 7 a 8, y lo más preferentemente 7,5.

En caso de BPTI, se pueden emplear preferentemente las concentraciones proteicas de 500 a 1000 [mg/l], más preferentemente 600 a 800 [mg/l] e, incluso más preferentemente, 700 a 800 [mg/l], L-cisteína debería estar incluida en la mezcla de replegamiento con el fin de tener en cuenta la formación de enlaces disulfuro estabilizadores, preferentemente a 2,5 a 4 [mM], más preferentemente al 3,0 a 3,5 [mM], TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> debería haber preferentemente al 0,2 a 1,4 [M], más preferentemente al 0,3 a 1,0 [M]. El pH del tampón se ajusta a aproximadamente 7-9, más preferentemente 7 a 8, y lo más preferentemente 7,5.

Incluso más sorprendente, la trietanolamina solubiliza de forma efectiva intermedios plegados eficazmente (800%), no afecta la pureza del proteína replegada (44,1% que es comparable al control de fosfato), dando como resultado el mejor rendimiento de replegado (1039% en comparación con el control fosfato).

Por ejemplo, derivado de Interleucina-4, como se muestra en el **ejemplo 5**, se puede volver a plegar en un sistema de tamponamiento combinado de TEA e iones sulfato (valoración de ácido sulfúrico). Se pueden emplear concentraciones proteicas de preferentemente 250 a 1000 [mg/l], más preferentemente 400 a 700 [mg/l] e incluso más preferentemente, 450 a 550 [mg/l]. L-cisteína debería estar incluida en la mezcla de replegamiento para permitir la formación de enlaces disulfuro estabilizadores, preferentemente a 0,4 a 4 [mM], más preferentemente a 0,8 a 2 [mM]. TEA/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> debería estar presente preferentemente a 0,5 a 2 [M], más preferentemente al 0,8 a 1,5 [M+h]. El pH del tampón se ajusta a aproximadamente 7-9, más preferentemente 7 a 8, y lo más preferentemente 7,5.

Tomando los datos enumerados en la Tabla 1 conjuntamente, se puede deducir una relación de estructura-función, revelando un principio de química general: La agregación más eficaz son supresores primarios, más preferentemente aminas secundarias o terciarias con sustituciones R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub>, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> puede ser cualquier combinación de los ligandos H, O = C-NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>. El residuo R<sub>3</sub> puede ser C(NH<sub>2</sub>)=NH, C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH o H.

El papel central de la función amina se demostró con canavanina-sulfato, donde el grupo amino central se intercambia por un grupo oxígeno, dando como resultado una pérdida completa de recuperación de proteína soluble (igual al control sin la adición de cualquier supresor) y a la pérdida de derivado de Interleucina-4 replegado correctamente. Los datos enumerados en la Tabla 1 también muestran que el contrairón puede jugar también un papel significativo. Los iones de sulfato son superiores a iones de cloro con respecto al rendimiento de replegado y a la inhibición de agregación proteica. Por lo tanto, una combinación de una amina como se describe anteriormente y una sal de sulfato de ácido sulfúrico inhiben más eficazmente la formación de agregados de proteína y permiten a la proteína replegarse en su conformación nativa.

### Ejemplo 1

#### Procedimientos analíticos

La RP-HPLC analítica se lleva a cabo en una columna YMC C4 (5  $\mu$ l, 200A, 4,6 x 250 mm) a un caudal de 1,0 ml/min. La detección se lleva a cabo a 210 nm. La columna pre-opcional (20 mm x 4 mm) se empaqueta con una RPC Source 50 15 (Pharmacia, Suecia). El Tampón A es TFA al 0,1%, el tampón B es TFA al 0,1% con acetonitrilo al 70%. El gradiente se lleva a cabo como sigue: 0-2 min, B al 40%; 2-19,5 min, B al 40%-85%; 19,5-20 min, B al 85%-100%; 20-21 min, B al 100%, 21-22 min, B al 100%-40% B, 22-25 min, B al 40% (reequilibrado). Interleucina-4 plegada correctamente eluye a un tiempo de retención de 16 minutos empleando un sistema Hewlett-Packard CL 1100. El BPTI plegado correctamente eluye a un tiempo de retención de 12,8 min. Las muestras de replegamiento se filtran de forma estéril (punto de corte 0,22  $\mu$ m) antes del análisis.

El pico que eluye al tiempo de retención de la forma nativa se integra dando el rendimiento de replegado expresado en 30 unidades [mg/l] y corresponde a la concentración de proteínas plegadas correctamente (calculada en base a las curvas estándar externas). Las cuentas del área total corresponden a la concentración de proteína soluble presente en

la mezcla de replegamiento expresada en unidades [mg/l]. La proporción de estos dos valores da la pureza de la proteína replegada expresada en unidades [%].

La concentración de proteína total se determinó después de precipitación con ácido trifluoroacético, que se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos estándar de bioquímica, usando el ensayo de BCA comercialmente disponible (Pierce, EE.UU.) y seroalbúmina bovina (Boehringer-Mannheim, Alemania) como estándar de calibración.

## Ejemplo 2

### Preparación de materiales de partida para experimentos de replegamiento

Se solubilizaron proteínas en presencia de Tris 0,2 M-HCl, pH 9 conteniendo clorhidrato de guanidino 8 M dando una concentración final de proteína de 10 [g/l]. Los grupos SH se sulfitolizaron después mediante la adición de 30 [g/l] de sulfito de sodio y 60 [g/l] de tetratiónato de potasio. Después de la adición de sulfito, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min con el fin de permitir la finalización de la reacción de sulfito con cualesquier disulfuros presentes en las proteínas solubilizadas. Posteriormente, se añadió tetratiónato y la solución se agitó durante 90 minutos con el fin de permitir la conversión de grupos SH a disulfuros y la escisión a grupos S-sulfito haciendo funcionar la reacción hasta completar la reacción. Finalmente, la solución se filtró a través de un filtro en profundidad de punto de corte 1,2 µm (por ejemplo Sartopure PP2,1,2 µm, Sartorius AG, Alemania). La solución se diafiltró después frente a 5 volúmenes de tampón de diafiltración constituido por Tris-HCl 0,2 M, pH 9 conteniendo clorhidrato de guanidio 4 M empleando una membrana de ultrafiltración por destilación (punto de corte 10.000 PM, por ejemplo Hydrosart 10 kD, Sartorius AG, Alemania). El retentato recogido del aparato de ultrafiltración contenía una concentración de proteína final de aproximadamente 10 [g/l] y se almacenó a 2-8°C durante hasta 2 semanas.

## Ejemplo 3

### Efectos de diferentes productos químicos en el replegamiento de derivado de Interleucina-4

La solución de la proteína del Ejemplo 2, que contiene proteína sulfitolizada, desnaturalizada, se diluye en tampón de replegamiento dando una concentración de proteína final de 250 [mg/l] tal como se determina mediante el ensayo de BCA (Pierce, EE.UU.). El tampón de replegado consistió en los siguientes ingredientes:

- tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5
- ácido etilendiaminatetracético 1 mM, sal tetrasódica (EDTA)
- L-cisteína 0,8 mM.
- Una cierta cantidad de supresor de agregación tal como se indica en la Tabla 1.

El volumen final total de la solución de replegamiento fue 50 ml (viales de vidrio, Schott, Alemania). Los viales de vidrio se taparon con parafilm. El replegamiento se dejó funcionando para finalización en 24-36 horas con agitación en un agitador de barra magnética (100-200 rpm). A intervalos, se extrajeron las muestras y se analizaron por RP-HPLC (véase Ejemplo 1).

**Tabla 1.** Resultados del rastreo de los supresores de agregación

Grupo	Compuesto	Intervalo de concentración [mM]	Concentración óptima [mM]	Rendimiento de Replegamiento Relativo [%] de control fosfato	Solubilidad de Proteína Relativa [%] de control fosfato	Pureza [en %]
Control	Fosfato	50	0	100	100	44,7
Aminoácidos	L-Lisina	0-1500	400	386	315	32,8
	L-Asparragina	0-200	200	107	93	37,8
	L-Glutamina	0-150	75	99	89	37,4
	D,L-Norleucina	0-100	50-100	106	93	37,2
	L-Arginina	0-1200	600	873	845	32,5
Derivados de arginina	%-ácido guanidino-butírico	0-250	250	283	472	20,0

	4-guanidino-butano-2-ol	0-1000	600	299	740	13,8
	4-guanidino-butilamina-sulfato	0-1000	200	177	456	20,6
	Canavanina-sulfato	0-1200	600	0	100	0
<b>Agentes caotrópicos</b>	Urea	0-1500	1500	285	209	37,6
	GuHCl	0-1000	750	609	915	18,4
	N-metilguanidinio-sulfato	0-1000	600	720	1063	19,9
	N,N-dimetilguanidinio-sulfato	0-1000	200	645	700	27,1
	N,N-diethylguanidinio-sulfato	0-1000	400	691	963	21,1
	Bis-(1 - Aminoguanidinio-sulfato	0-1000	400	798	1037	22,7
<b>Detergentes</b>	Tween 80	0,1-100	100	169	221	21,1
	Zwittergent 3-14	0,01-10	0,01	85	76	30,3
	Zwittergent 3-12	0,1-100	0,1	110	168	18,3
	CHAPS	0,5-500	5	120	167	28,9
	Tritón X-100	0,1-100	1	140	570	6,8
	CTAC	0,1-100	100	57	735	1,2
<b>Disolventes</b>	Etanol	1-100	50	104	112	37,1
	1-propanol	1-100	10	96	103	37,6
	1-butanol	1-100	5	102	107	38,5
	1-hexanol	1-100	1	88	80	44,1
<b>Sales</b>	NaCl	0-1000	800-1000	495	575	41,4
	NH <sub>4</sub> Cl	0-1000	800-1000	504	635	37,2
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0-1000	0,200	456	505	41,2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0-1000	400	540	600	41
<b>Tampones</b>	Fosfato	0-1000	200	182	175	41,5

	TRIS-HCl	0-1000	1000	489	505	24,6
	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0-1000	1000	677	850	37,8
	Etanolamina-HCl	0-1000	400	431	760	25,8
	Etanolamina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-600	400	61	81	25,7
	Trietanolamina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0-2000	1500	1039	800	44,1
<b>Otros</b>	Acetamida	0-2000	800-1500	136	126	34,9
	PEG 200	0-1	0,5-1,0	102	89	38,5
	PEG 400	0-1	1,0	111	93	41,2
	PEG 600	0-1	0,05-0,25	111	114	33,1
	PEG 1000	0-1	0,25	101	89	38,8
	PEG 2000	0-1	0,5-1,0	132	122	35,2
	PEG 3000	0-1	0,1-0,5	122	104	35
	PEG 4000	0-1	0,1	153	133	37,6

Control: Condiciones de replegamiento: tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, L-cisteína 0,4 mM, 250 mg/l de concentración total de proteínas, Rendimiento de replegamiento: 8 mg/l de Interleucina-4 plegada correctamente R121D Y124D (~3% de proteína total), 23,5 mg/l de recuperación de proteína soluble (-9% de la proteína total),

#### Ejemplo 4

#### Optimización multifactorial del replegamiento del derivado de Interleucina-4 empleando el sistema basado en TRIS-ácido sulfúrico

- 5 Una combinación atractiva de supresores de agregación es el sistema de base de TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Por lo tanto, este sistema se eligió para optimización adicional empleando un análisis multifactorial.

El volumen final total de la solución de replegamiento fue 50 ml (viales de vidrio, Schott, Alemania). Los viales de vidrio se taparon con parafilm. El replegado se dejó funcionando hasta finalización dentro de 24-36 horas con agitación en un agitador de barra magnética (100-200 rpm). A intervalos, se extrajeron las muestras y se analizaron por RP-HPLC (véase el Ejemplo 1).

La solución de la proteína del Ejemplo 2, que contiene proteínas desnaturalizadas, sulfitolizadas, se diluye en tampón de replegado dando una concentración final de proteína indicada en la Tabla 3. Se investigaron los siguientes aspectos de la composición tampón de replegado: concentración de base de TRIS-base (0,5 a 3 [M]), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dependiendo de concentración de TRIS; 0,4 hasta 1,4 [M]), concentración residual de clorhidrato de guanidinio (80-400 mM), concentración de L-cisteína (0,4 a 4 [mM]), y concentración de proteína inicial (50 a 1000 [mg/l]). El pH del tampón de replegamiento se ajustó a 7,5. Todas las mezclas de replegamiento contenían EDTA 1 mM.

Los experimentos descritos en este ejemplo se diseñaron permitiendo un análisis estadístico multifactorial de los datos de rendimiento de derivado de la Interleucina-4 plegada correctamente con el fin de valorar la importancia de todos los factores individuales y de todas las interacciones de dos factores. Se generó un diseño experimental cúbico parcial y los datos resultantes también se analizaron empleando un modelo cúbico parcial. Los coeficientes de los polinomios del modelo cúbico parcial se dan en la Tabla 2.

Término	TRIS	CYS	Proteína	
0	0	0	0	CONSTANTE
1	1	0	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]
2	0	1	0	Cisteína_[mM]
3	0	0	1	Proteína_[mg/l]
4	1	1	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Cisteína_[mM]
5	1	0	1	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Proteína_[mg/l]
6	0	1	1	Cisteína_[mM]*Proteína_[mg/l]
7	2	0	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2
8	0	2	0	Cisteína_[mM]^2
9	0	0	2	Proteína_[mg/l]^2
10	1	2	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Cisteína_[mM]^2
11	2	1	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2*Cisteína_[mM]
12	1	0	2	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Proteína_[mg/l]^2
13	2	0	1	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2*Proteína_[mg/l]
14	0	1	2	Cisteína_[mM]*Proteína_[mg/l]^2
15	0	2	1	Cisteína_[mM]^2*Proteína_[mg/l]

**Tabla 2.** Modelo cúbico parcial empleado para el diseño experimental de la optimización de replegamiento de Interleucina-4 R121D Y124D

**Tabla 3.** Efecto de condiciones de solución (sistema TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en rendimiento de replegamiento de Interleucina-4 R121D Y124D, recuperación de proteína soluble, rendimiento de replegamiento general y pureza

N.º Ensayo	de TRIS-base	Cisteína	Proteína	Rendimiento de Referencia [mg/l]	Recuperación de proteína [%]	Rendimiento de replegamiento general [%]	Pureza [%]
1	3	4	50	9	81,3	18,00	22,1
2	3	0,4	1000	2,92	10,65	0,29	2,7
3	0,5	4	525	90,45	48,55	17,23	35,5
4	0,5	2,2	1000	137,7	46,34	13,77	29,7
5	1,75	4	1000	199,72	54,77	19,97	36,5
6	1,75	0,4	1000	25,05	27,23	2,50	9,2
7	3	2,2	50	11,3	60,79	22,60	37,2
8	0,5	4	50	10,37	53,54	20,73	38,7

9	3	0,4	525	68,32	55,36	13,01	23,5
10	0,5	0,4	525	81,82	36,66	15,58	42,5
11	1,75	0,4	50	13,6	62,08	27,21	43,8
12	0,5	0,4	1000	15,8	18,89	1,58	8,4
13	3	4	1000	176,31	43,94	17,63	40,1
14	1,75	4	525	131,19	68,94	24,99	36,2
15	1,3333	1,6	366,667	93,63	68,21	25,54	37,4
16	2,1667	1,6	366,667	91,95	69,77	25,08	35,9
17	3	2,8	683,333	134,38	55,72	19,67	35,3
18	0,5	1,6	683,333	110,68	48,94	16,20	33,1
20	2,1667	2,8	50	12,49	71,59	24,98	34,9
1	3	4	50	9,38	52,32	18,76	35,9
2	3	0,4	1000	8,94	18,32	0,89	4,9
3	0,5	4	525	97,16	50,43	18,51	36,7
4	0,5	2,2	1000	140,29	45,63	14,03	30,7
5	1,75	4	1000	197,53	56,85	19,75	34,7
6	1,75	0,4	1000	19,75	27,61	1,97	7,2
7	3	2,2	50	15,08	72,5	30,15	41,6

Los rendimientos obtenidos con combinaciones seleccionadas de estos componentes se muestran en la Tabla 3. La inspección de estos resultados muestra que, bajo las condiciones experimentales empleadas, las siguientes tendencias fueron patentes: (1) los mejores rendimientos de replegamiento se obtienen a concentraciones de proteína más altas (750-1000 [mg/l]); (2) los mejores rendimientos de replegamiento generales se obtienen a 250 a 650 [mg/l] de concentración de proteína total; (3) el intervalo de concentración de L-cisteína óptimo es 2,5 a 4 [mM]; (4) el intervalo de concentración de Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> óptimo es 1,4 a 2,4 [M]; (5) la mejor recuperación de proteína se obtiene a concentraciones de proteína bajas (50 a 250 [mg/l]), concentraciones altas de Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y (2-3 [M]) a 3,5 [mM] de L-cisteína; (6) la mejor pureza se obtiene a concentraciones de proteína altas (400-1000 [mg/l]), concentraciones de L-cisteína altas (2,5-4 [mM]). La pureza es independiente de la concentración de Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Un compromiso entre el rendimiento óptimo de replegamiento, la pureza y la recuperación de proteínas se identificó empleando los siguientes ajustes: 500 mg/l de proteína total, L-cisteína 3,3 mM, Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y EDTA 1 mM.

Los puntos de control empleando estas condiciones óptimas revelaron que la respuesta predecida y los valores de respuesta medidos se ajustan razonablemente bien, indicando que el modelo es adecuado.

#### Rendimiento de replegamiento general

Predecido: 24,9 [%] (± 1,84 Error Estándar)

#### Recuperación de proteína

Medida: 25,4 [%] (± 0,37 Error Estándar)

Predicha: 65,9 [%] (± 6,55 Error Estándar)

#### Pureza

Medida: 62,9 [%] (± 0,63 Error Estándar)

Predicha: 38,6 [%] (± 3,63 Error Estándar)

#### Rendimiento de replegamiento

Medida: 40,4 [%] (± 0,45 Error Estándar)

Predicha: 127 [mg/l] (± 14,5 Error Estándar)

Medida: 126,9 [mg/l] (± 1,85 Error Estándar)

**Ejemplo 5****Optimización multifactorial de replegamiento de derivado de Interleucina-4 empleando el sistema basado en Trietanolamina-ácido sulfúrico**

Otra combinación atractiva de supresores de agregación es el sistema de Trietanolamina (TEA)/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Por lo tanto, 5 este sistema se eligió para optimización adicional y de aumento en la escala de concentración de proteínas.

El volumen final total de la solución de replegamiento fue 50 ml (viales de vidrio, Schott, Alemania). Los viales de vidrio se taparon con parafilm. El replegamiento se dejó funcionar hasta finalización en 24-36 horas con agitación en un agitador de barra magnética (100-200 rpm). A intervalos, se extrajeron las muestras y se analizaron por RP-HPLC (véase el Ejemplo 1).

- 10 La solución de la proteína del Ejemplo 2, que contiene proteína sulfitolizada, desnaturalizada, se diluye en tampón de replegamiento dando una proteína final indicada en la Tabla 5. Los siguientes aspectos de la composición de tampón de replegamiento se investigaron: concentración de TEA (1 a 2 [M]), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dependiendo de concentración de TEA), concentración de clorhidrato de guanidino residual (80-400 mM), concentración de L-cisteína (0,4 a 10 [mM]), y concentración de proteína inicial (50 a 1000 [mg/l]). El pH del tampón de replegamiento se ajustó a 7,5. Todas las 15 mezclas de replegamiento contenían EDTA 1 mM.

Los experimentos descritos en este ejemplo se diseñaron permitiendo análisis estadístico multifactorial de los datos de rendimiento del derivado de Interleucina-4 correctamente plegado con el fin de valorar la importancia de todos los factores individuales y de todas las interacciones de dos factores. Se generó un diseño experimental cúbico parcial y los 20 datos obtenidos también se analizaron empleando un modelo cúbico parcial. Los coeficientes de los polinomios del modelo cúbico parcial se dan en la Tabla 4.

Término	TEA	CYS	Proteína	Término
0	0	0	0	CONSTANTE
1	1	0	0	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]
2	0	1	0	Cisteína [mM]
3	0	0	1	Proteína [mg/l]
4	1	1	0	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]*Cisteína [mM]
5	1	0	1	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]*Proteína [mg/l]
6	0	1	1	Cisteína [mM]*Proteína [mg/l]
7	2	0	0	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M] <sup>2</sup>
8	0	2	0	Cisteína [mM] <sup>2</sup>
9	0	0	2	Proteína [mg/l] <sup>2</sup>
10	1	2	0	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]*Cisteína [mM] <sup>2</sup>
11	2	1	0	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M] <sup>2</sup> *Cisteína [mM]
12	1	0	2	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M]*Proteína [mg/l] <sup>2</sup>
13	2	0	1	TEA-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [M] <sup>2</sup> *Proteína [mg/l]
14	0	1	2	Cisteína [mM]*Proteína [mg/l] <sup>2</sup>
15	0	2	1	Cisteína [mM] <sup>2</sup> *Proteína [mg/l]

**Tabla 4.** El modelo cúbico parcial empleado para el diseño experimental de la optimización del replegamiento de Interleucina-4 R121D Y124D

**Tabla 5.** Efecto de las condiciones de solución (sistema TEA-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en rendimiento de replegamiento de Interleucina-4 R121D Y124D, recuperación de proteína soluble, rendimiento general de replegamiento y pureza.

N.º de Ensayo	de TEA	Cisteína	Proteína	Rendimiento de Ref.	Recuperación de proteínas	Rendimiento de replegamiento general	Pureza
[-]	[M]	[mM]	(mg/l)	(mg/l)	[%]	[%]	[%]
1	2	10	0,1	5,91	138,09	5,9	4,3
2	2	0,4	1	135,12	49,49	13,5	27,3
3	0,5	10	0,55	15,23	16,92	2,8	16,4

4	0,5	5,2	1	70,06	19,28	7	36,3
5	1,25	10	1	49,37	18,06	4,9	27,3
6	0,5	5,2	0,1	9,64	66,78	9,6	14,4
7	1,25	0,4	1	167,96	42,5	16,8	39,5
8	2	5,2	0,1	13,66	103,17	13,7	13,2
9	0,5	10	0,1	3,56	76,7	3,6	4,6
10	2	0,4	0,55	45,39	54,66	8,3	15,1
11	0,5	0,4	0,55	68,41	31,3	12,4	39,7
12	1,25	0,4	0,1	30,09	77,34	30,1	38,9
13	0,5	0,4	1	90,11	21,55	9	41,8
14	2	10	1	63,75	22,94	6,4	27,8
15	0,5	0,4	0,1	24,18	59,26	24,2	40,8
16	1,25	10	0,55	43,47	31,42	7,9	25,2
17	1	3,6	0,4	107,54	61,7	26,9	43,6
18	1,5	3,6	0,4	118,95	70,26	29,7	42,3
19	2	6,8	0,7	115,96	45,83	16,6	36,1
20	0,5	3,6	0,7	97,81	32,69	14	42,7
21	1,5	6,8	0,1	12,29	75,29	12,3	16,3
1	2	10	0,1	6,51	91,62	6,5	7,1
2	2	0,4	1	136,71	44,08	13,7	31,0
3	0,5	10	0,55	17,13	13,98	3,1	22,3
4	0,5	5,2	1	68,29	17,34	6,8	39,4
5	1,25	10	1	53,25	16,96	53	31,4
6	0,5	5,2	0,1	10,75	44,69	10,8	24,1
7	1,25	0,4	1	170,11	39,82	17	42,7
8	2	5,2	0,1	18,01	81,64	18	22,1
9	0,5	10	0,1	4,92	43,65	4,9	11,3

Los rendimientos obtenidos con combinación seleccionada de estos componentes se muestran en la Tabla 5. La inspección de estos resultados muestra que, bajo las condiciones experimentales empleadas, las siguientes tendencias son patentes: (1) los mejores rendimientos de replegamiento se obtienen a altas concentraciones proteicas (750-1000 [mg/l]); (2) los mejores rendimientos de replegamiento general se obtienen a concentración total de proteínas 100 a 550 [mg/l]; (3) el intervalo de concentración de L-cisteína óptima es 0,4 a 4 [mM]; (4) el intervalo de concentración de TEA-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es 1 a 1,6 [M]; (5) se obtiene mejor recuperación de proteínas a concentraciones proteicas bajas (50 a 250 [mg/l]), altas concentraciones de TEA-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5-2 [M]) y 4 a 10 [mM] de L-cisteína; (6) se obtiene mejor pureza a altas concentraciones proteicas (600-1000 [mg/l]), a las concentraciones de L-cisteína que varían entre 0,4 y 4 [mM] y a las concentraciones de TEA-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que varían entre 0,8 y 1,5 [M]. Un compromiso entre rendimiento de replegado óptimo, pureza y recuperación de proteínas se identificó empleando los siguientes ajustes: 500 mg/l de proteína total, L-cisteína 0,8 mM, TEA-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4 M y EDTA 1 mM.

Los puntos de control empleando estas condiciones óptimas revelaron que los valores de la respuesta predichos y medidos se ajustan razonablemente bien, indicando que el modelo es adecuado.

<b>Rendimiento de replegamiento general</b>	Predicha:	24,6 [%] ( $\pm 4.1$ StdErr)
	Medida:	24,3[%] ( $\pm 0.8$ StdErr)
<b>Recuperación de proteína</b>	Predicha:	52,8[%] ( $\pm 10.5$ StdErr)
	Medida:	58,2[%] ( $\pm 4.5$ StdErr)
<b>Pureza</b>	Predicha:	43,2[%] ( $\pm 5.3$ StdErr)
	Medida:	41,8[%] ( $\pm 3.9$ StdErr)
<b>Rendimiento de replegamiento</b>	Predicha:	106,8[%] ( $\pm 16.9$ StdErr)
	Medida:	121,6[%] ( $\pm 2.0$ StdErr)

### Ejemplo 6

#### **Replegamiento de inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI, aprotinina) empleando el sistema basado en TRIS-ácido sulfúrico**

- 5 Con el fin de demostrar que el sistema de TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se puede emplear también para el replegamiento de otras proteínas que los derivados de Interleucina-4, el sistema de TRIS/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se optimizó también para BPTI.

El volumen final total de la solución del replegamiento fue 50 ml (viales de vidrio, Schott, Alemania). Los viales de vidrio se taparon con parafilm. El replegamiento se dejó funcionando para finalización dentro de 24-36 horas con agitación en un agitador de barra magnética (100-200 rpm). A intervalos, se extrajeron las muestras y se analizaron por RP-HPLC (véase el Ejemplo 1).

La solución de la proteína del Ejemplo 2, que contiene proteína sulfitolizada, desnaturalizada se diluye en tampón de replegamiento dando una concentración de proteína final indicada en la Tabla 7. Se investigaron los siguientes aspectos de la composición de tampón de replegamiento: concentración de TRIS (0 a 2 [M]), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (dependiendo de la concentración de base TRIS), concentración de clorhidrato de guanidinio residual (80-400 mM), concentración de L-cisteína (0,1 a 4 [mM]), y concentración de proteína inicial (intervalo de 50 a 1000 [mg/l]). El pH del tampón de replegamiento se ajustó a 7,5. Todas las mezclas de replegamiento contenían EDTA 1 mM.

Los experimentos descritos en este ejemplo se diseñaron permitiendo análisis estadístico multifactorial de los datos de rendimiento de la BPTI plegada correctamente con el fin de valorar la importancia de todos los factores individuales y todas las interacciones entre dos factores. Se generó un diseño experimental cúbico parcial y los datos resultantes se analizaron también empleando un modelo cúbico parcial. Los coeficientes de los polinomios del modelo cúbico parcial se dan en la Tabla 6.

Término	TRIS	CYS	Proteína	Término
0	0	0	0	CONSTANTE
1	1	0	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]
2	0	1	0	Cisteína_[mM]
3	0	0	1	Proteína_[mg/l]
4	1	1	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Cisteína_[mM]
5	1	0	1	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Proteína_[mg/l]
6	0	1	1	Cisteína_[mM]*Proteína_[mg/l]
7	2	0	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2
8	0	2	0	Cisteína_[mM]^2
9	0	0	2	Proteína_[mg/l]^2
10	1	2	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Cisteína_[mM]^2
11	2	1	0	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2*Cisteína_[mM]
12	1	0	2	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]*Proteína_[mg/l]^2
13	2	0	1	TRIS-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _[M]^2*Proteína_[mg/l]
14	0	1	2	Cisteína_[mM]*Proteína_[mg/l]^2
15	0	2	1	Cisteína_[mM]^2*Proteína_[mg/l]

Términos lineales

Términos de interacción

Términos cuadráticos

Términos cúbicos parciales

**Tabla 6.** Modelo cúbico parcial empleado para el diseño experimental de la optimización del replegamiento de BPTI**Tabla 7.** Efecto de condiciones de solución en rendimiento de replegamiento de BPTI, recuperación de proteína soluble y rendimiento de replegamiento general.

N.º de Ensayo	TRIS-base	Cisteína	Proteína	Rendimiento de Referencia	Recuperación de proteínas	Rendimiento Replegamiento general	Pureza
[ $\cdot$ ]	[M]	[mM]	(mg/l)	(mg/l)	[%]	[%]	[%]
1	2	4	50	20,43	85,69	40,86	47,7
2	2	0,1	1000	0	0	0	0
3	0	4	525	159,29	61,05	30,34095	49,7
4	0	2,05	1000	275,45	70,84	27,545	38,9
5	1	4	1000	256,9	71,75	25,69	35,8
6	0	2,05	50	35,67	136,48	71,34	52,3
7	1	0,1	1000	0	2,59	0	0
8	2	2,05	50	19,45	80,85	38,9	48,1
9	0	4	50	8,51	39,92	17,02	42,6
10	2	0,1	525	0	0	0	0
11	0	0,1	525	0	0,4	0	0
12	1	0,1	50	15,71	69,04	31,42	45,5
13	0	0,1	1000	0	1,05	0	0
14	2	4	1000	158,93	36,23	15,893	43,9

15	0	0,1	50	5,03	14,13	10,06	71,2
16	1	4	525	18,64	89,48	3,55047 6	4
17	0,6667	1,4	366,667	107,29	83,34	29,2608 8	35,1
18	1,3333	1,4	366,667	104,5	82,6	28,4999 7	34,5
19	2	2,7	683,333	97,4	41,66	14,2536 7	34,2
20	0	1,4	683,333	149,44	51,46	21,8692 8	42,5
21	1,3333	2,7	50	14,08	76,21	28,16	36,9
1	2	4	50	16,15	69,37	32,3	46,5
2	2	0,1	1000	1,47	3,44	0,147	4,3
3	0	4	525	162,49	58,91	30,9504 8	52,5
4	0	2,05	1000	273,77	68,91	27,377	39,7
5	1	4	1000	265,9	78,2	26,59	34
6	0	2,05	50	9,73	39,56	19,46	49,2
7	1	0,1	1000	0	0,94	0	0
8	2	2,05	50	19,18	77,88	38,36	49,3

Los rendimientos obtenidos con combinación seleccionada de estos componentes se muestran en la Tabla 7. La inspección de estos resultados muestra que, bajo las condiciones experimentales empleadas, son patentes las siguientes tendencias: (1) se obtienen los mejores rendimientos de replegamiento a altas concentraciones proteicas (750-1000 [mg/l]); (2) se obtienen los mejores rendimientos de replegamiento general a concentración proteica total de 500 a 1000 [mg/l]; (3) el intervalo de concentración de L-cisteína óptimo es 2,5 a 4 [mM]; (4) el intervalo de concentración de TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es 0,2 a 1,0 [M]; (5) se obtiene mejor pureza a concentraciones de proteínas más bajas (50 a 100 [mg/l]), concentraciones de TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> moderado (0,9-1,4 [M]) y L-cisteína de 1,8 a 3,3 [mM]; (6) se obtiene mejor pureza a concentraciones proteicas bajas (50-100 [mg/l]), concentraciones de L-cisteína que varían entre 0,1 y 0,4 [mM]) y a las concentraciones de TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que varían entre 0,1 y 0,5 [M].

Un compromiso entre rendimiento de replegamiento óptimo, pureza y recuperación de proteína se identificó empleando los ajustes siguientes: 700 mg/l de proteína total, L-cisteína 3,3 mM, TRIS-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M y EDTA 1 mM.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para renaturalización de Interleucina 4 o una mutéína de interleucina 4 a concentraciones proteicas de 250 a 1000 [mg/l] que comprende añadir a una solución de proteínas desnaturalizadas, químicamente modificadas o reducidas un tampón que contenga L-Cisteína y Tris-(hidroximetil)-aminometano/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en una concentración de 1 a 3 mol/l o trietanolamina/H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> en una concentración de 0,5 a 2 moles/l.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el tampón contiene adicionalmente un potenciador de solubilidad.
3. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que el potenciador de solubilidad es un ion.
4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que el potenciador de solubilidad es cloruro.