



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 203**

51 Int. Cl.:

A61K 38/02 (2006.01)	A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)	A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)	A61K 38/27 (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)	C07K 2/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)	C07K 14/505 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)	C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)	C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)	C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01952657 .3**

96 Fecha de presentación : **12.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1315513**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2003**

54 Título: **Ligación química "seudo"- natural.**

30 Prioridad: **08.09.2000 US 231339 P**
29.09.2000 US 236377 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**
9373 Towne Centre Drive
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Kent, Stephen, B. H.;**
Botti, Paolo;
Low, Donald, W.;
Bradburne, James, A.;
Hunter, Christie, L.;
Chen, Shiah-Yun;
Cressman, Sonya y
Kochendoerfer, Gerd

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 203 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

Ligación química "seudo"-natural.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para ampliar la técnica de la ligación química natural con el fin de permitir el enlace de una gama más amplia de péptidos, polipéptidos, mediante un enlace amida. Se dan a conocer los procedimientos y las utilidades para dichas proteínas y proteínas derivadas.

10

Antecedentes de la invención

Durante los últimos 30 años, la atención médica se ha concentrado de manera creciente en la posibilidad de utilizar proteínas producidas de forma natural como fármacos terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades.

15

Las técnicas de ADN recombinante se han convertido en el procedimiento principal para la producción comercial de muchos polipéptidos y proteínas debido a las grandes cantidades que pueden producirse en bacterias y otras células hospedadoras. La producción de proteínas recombinantes implica transfectar o transformar las células hospedadoras con ADN que codifica la proteína exógena deseada y el crecimiento de las células en condiciones que favorecen la expresión de la proteína recombinante. *E. coli* y la levadura resultan preferidas como hospedadores porque puede hacerse que produzcan proteínas recombinantes a valores altos (véase, la patente US nº 5.756.672 (Builder *et al.*).

20

Se han publicado numerosas patentes US con respecto a la expresión bacteriana general de proteínas codificadas por ADN recombinante (véase, por ejemplo, las patentes US nº 4.565.785; nº 4.673.641; nº 4.738.921; nº 4.795.706; nº 4.710.473). Desgraciadamente, la utilización de técnicas de ADN recombinante no se ha logrado en todos los casos. En algunas condiciones, determinadas proteínas heterólogas expresadas en grandes cantidades en hospedadores bacterianos precipitan dentro de las células en agregados densos, reconocidos como puntos brillantes, visibles dentro de la membrana de las células al microscopio de contraste de fase. Estos agregados de proteínas precipitadas se denominan "cuerpos refractantes", y pueden constituir una parte significativa de las proteínas totales de la célula (Brems *et al.*, *Biochemistry* (1985) 24: 7662).

25

30

La recuperación de las proteínas de estos cuerpos ha presentado numerosos problemas, tales como la separación de la proteína encajada dentro de la célula a partir del material celular y de las proteínas que lo alojan, y cómo recuperar las proteínas del cuerpo de inclusión en forma biológicamente activa. Para artículos generales de revistas sobre cuerpos refractantes véase Marston, anteriormente, Mitraki y King, *Bio/Technology*, 7: 690 (1989); Marston y Hartley, *Methods in Enzymol.*, 182: 264-276 (1990); Wetzel, "Protein Aggregation *In Vivo*: Bacterial Inclusion Bodies and Mammalian Amyloid," en *Stability of Protein Pharmaceuticals: In Vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization*, Ahern y Manning (Eds.) (Plenum Press, 1991); y Wetzel, "Enhanced Folding and Stabilization of Proteins by Suppression of Aggregation *In Vitro* and *In Vivo*," en *Protein Engineering-A Practical Approach*; Rees, A. R. *et al.* (Eds.) (IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1991). Resulta por lo tanto necesaria una vía alternativa de producción de proteínas bioactivas.

35

40

Una alternativa a la producción recombinante de proteínas implica la utilización de los principios de la química orgánica para sintetizar proteínas. Los procedimientos existentes para la síntesis química de proteínas incluyen la síntesis en fase sólida paso a paso, y la condensación del fragmento ya sea en solución o en fase sólida. La síntesis en fase sólida clásica paso a paso de Merrifield implica el enlace covalente de un aminoácido correspondiente al aminoácido del terminal carboxi de la cadena peptídica deseada a un soporte sólido y la ampliación de la cadena polipeptídica hacia extremo amino por acoplamiento paso a paso de los derivados de aminoácidos activados que tienen grupos carboxilo activados. Después de la terminación del ensamblado de la cadena peptídica unida en fase sólida totalmente protegida, el enlace covalente en fase sólida de péptido se escinde por la química adecuada y los grupos protectores se eliminan para dar el producto polipéptido.

45

50

Existen desgraciadamente muchos inconvenientes para el procedimiento de síntesis en fase sólida paso a paso, incluyendo la formación de la fase sólida unida por productos que proceden de la reacción incompleta en las etapas de acoplamiento y desprotección en cada ciclo. Cuanto mayor es la cadena peptídica, mayor es el reto para obtener productos de alta pureza bien definidos. La síntesis de proteínas y polipéptidos grandes por esta vía es una tarea extensa y laboriosa.

55

El método de condensación de fragmentos en fase sólida (conocido también como condensación de segmentos) se diseñó para superar las dificultades en la obtención de polipéptidos largos por el procedimiento de síntesis paso a paso en fase sólida. El procedimiento de condensación de segmentos implica la preparación de varios segmentos peptídicos por el procedimiento de síntesis paso a paso en fase sólida, seguido de escisión de la fase sólida y purificación de estos segmentos protegidos al máximo. Los segmentos protegidos se condensan uno a uno al primer segmento, que está unido a la fase sólida. Con frecuencia, sin embargo, se encuentran dificultades técnicas en muchas de las etapas de condensación de segmentos en fase sólida. Véase E. Atherton *et al.*, "Solid Phase

60

65

Fragment Condensation - The Problems", en *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* 11-25 (R. Epton, *et al.*, 1990). Por ejemplo, la utilización de grupos protectores en segmentos para bloquear reacciones de enlace indeseadas puede hacer frecuentemente que los segmentos protegidos poco solubles, interfieran en la activación eficaz del grupo carboxilo. La solubilidad limitada de los segmentos protegidos también puede interferir con la purificación de los segmentos protegidos. Véase K. Akaji *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 33:184-102 (1985). Los segmentos protegidos son difíciles de caracterizar con respecto a la pureza, la estructura covalente, y no son adecuados para ESMS analítica de alta resolución (espectrometría de masas con electroatomización) (basada en la carga). La racemización del resto del terminal C de cada segmento peptídico activado es también un problema, excepto si el enlace se realiza en restos de glicina. Por otra parte, la escisión del polipéptido unido a la fase sólida, completamente ensamblado procedente de la fase sólida y la eliminación de los grupos protectores frecuentemente pueden requerir procedimientos químicos enojosos y prolongados tiempos de reacción que producen la degradación del polipéptido completamente ensamblado.

La condensación de segmentos puede realizarse en solución en lugar de en fase sólida. Véase H. Muramatsu *et al.*, *Biochem. and Biophys. Res. Commn.* 203 (2): 1113-1139 (1994). Sin embargo, la condensación de segmentos en solución requiere la purificación de segmentos antes de la ligación así como la utilización de grupos protectores en una gama de diferentes grupos funcionales de cadena lateral para prevenir múltiples reacciones laterales indeseadas. Además, la ligación en solución no permite la fácil purificación y las etapas de lavado proporcionadas por las ligaciones en fase sólida. Además, las limitaciones con respecto a la solubilidad de segmentos peptídicos protegidos y los productos de reacción intermedios de péptidos protegidos empeoran.

La ligación química de segmentos peptídicos se ha explorado con el fin de resolver los problemas de solubilidad encontrados frecuentemente con péptidos protegidos al máximo. La ligación química implica la formación de un enlace covalente selectivo entre un primer componente químico y un segundo componente químico. Los grupos funcionales exclusivos, interreactivos presentes en el primer y segundo componentes pueden utilizarse para realizar la reacción de ligación quimioselectiva. Por ejemplo, la ligación química de péptidos y polipéptidos implica la reacción quimioselectiva de segmentos de péptidos o polipéptidos que son portadores de restos de aminoácido con terminal C y terminal N, exclusivos, interreactivos. Se han utilizado varias químicas diferentes con este fin, cuyos ejemplos incluyen la ligación química natural (Dawson *et al.*, *Science* (1994), 266: 776-779; Kent *et al.*, documento WO 96/3478; Kent *et al.*, documento WO 98/28434), ligación química formadora de oxima (Rose, *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* (1994), 116:30-34), ligación formadora de tioéster (Schnölzer, *et al.*, *Science* (1992), 256:221-225), ligación formadora de tioéter (Englebretsen, *et al.*, *Tet. Letts.* (1995), 36(48):8871-8874), ligación formadora de hidrazona (Gaertner, *et al.*, *Bioconj. Chem.* (1994), 5(4):333-338), y ligación formadora de tiazolidina y enlace formador de oxazolidina (Zhang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998), 95(16): 9184-9189; Tam, *et al.*, documento WO 95/00846; patente US nº 5.589.356) o por otros procedimientos (Yan, L. Z. y Dawson, P. E., "Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization," *J. Am. Chem. Soc.*, 2001; 123, 526-533; Gieselmann, *et al.*, *Org. Lett.*, 2001, 3(9):1331-1334; Saxon, *et al.*, "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds., *Org. Lett.*, 2000, 2, 2141-2143).

De estos procedimientos, solo el método de ligación química natural proporciona un producto de ligación con un enlace amida natural (es decir, péptido) en el punto de ligación. La metodología de la ligación química original (Dawson, *et al.*, anteriormente y el documento WO 96/34878) ha demostrado una recia metodología para generar un enlace amida natural en el punto de ligación. La ligación química natural implica una reacción quimioselectiva entre un primer segmento peptídico o polipeptídico que presenta un resto α -carboxitioéster en el terminal C y un segundo péptido o polipéptido que tiene un resto de cisteína en el terminal N. Una reacción de intercambio de tiol proporciona un intermedio unido al tioéster inicial, que espontáneamente se reconfigura para proporcionar un enlace amida natural en el punto de ligación a la vez que regenera el tiol de la cadena lateral de cisteína. El inconveniente principal del planteamiento de ligación química natural original es que requiere una cisteína en el terminal N, es decir, solamente permite el acoplamiento de segmentos de péptidos o polipéptidos que poseen una cisteína en el terminal N.

No obstante este inconveniente, se ha informado (documento WO 98/28434) de la ligación química natural de péptidos con otros aminoácidos con terminal N aparte de la cisteína. En este contexto, la ligación se realiza utilizando un primer segmento de péptido o polipéptido que tiene un α -carboxitioéster en el terminal C y un segundo segmento de péptido o polipéptido que tiene un grupo N-{auxiliar sustituido por tiol} en el terminal N, representado por la fórmula HS-CH₂-CH₂-O-NH-[péptido]. Después, de la ligación el grupo N-{auxiliar sustituido por tiol} se separa por escisión del grupo auxiliar HS-CH₂-CH₂-O-auxiliar para generar un enlace amida natural en el punto de ligación. Una limitación de este procedimiento es que la utilización de un grupo auxiliar mercaptoetoxi puede conducir con éxito a la formación de un grupo amida solamente en un resto de glicina. Esto produce un producto de ligación que en el momento de la escisión genera un resto de glicina en la posición del aminoácido N-sustituido del segundo péptido o segmento de polipéptido. Como tal, esta forma de realización del procedimiento es solo adecuada si se desea el producto de ligación de la reacción que contenga un resto de glicina en esta posición, y en cualquier caso puede ser problemático con respecto a los rendimientos de la ligación, la estabilidad de los precursores y la capacidad para eliminar el grupo auxiliar unido a O. Aunque pueden utilizarse otros grupos auxiliares, por ejemplo el HSCH₂-CH₂-NH-[péptido], sin limitar la reacción a la ligación a un resto de glicina, dichos grupos auxiliares no pueden eliminarse del producto ligado.

Por lo tanto, resulta necesario un sistema de ligación química ampliamente aplicable y recio que amplíe la ligación química natural a una amplia variedad de restos de aminoácidos, péptidos, polipéptidos, polímeros y otras moléculas por medio de un grupo auxiliar que contiene tiol fácilmente separable y eficaz, y que acople dichas moléculas junto con un enlace amida natural en el punto de ligación. La presente invención contempla éstas y otras necesidades.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra las reacciones generales de la ligación química seudonatural.

La figura 2 ilustra el procedimiento general de preparación de las proteínas bioactivas sintéticas de la presente invención.

La figura 3 representa la estructura básica de un tipo preferido de proteínas sintéticas estimulantes de eritropoyetosis.

La figura 4 presenta la estructura general de análogos SEP permutados en círculo que no tienen ningún terminal amino o carboxi libre. Los puntos de enlace a pPEG ("PEG de precisión", tal como se describió en la presente memoria) están en la misma posición con relación a los análogos de SEP. Los análogos de SEP están en forma de círculo por un enlace oxima entre las nuevas posiciones de los terminales N/C tales como P126C y A125X. El peso molecular total de los análogos de SEP estará comprendido entre aproximadamente 50 y 80 kDa, dependiendo del pPEG utilizado para la modificación de un análogo dado, con el P.M. hidrodinámico mediado por pPEG estimado que es mayor de aproximadamente 100 kDa.

La figura 5 presenta la estructura básica de proteínas sintéticas GCSF bioactivas. En la figura, "J" designa un resto codificado de forma no natural que tiene una cadena natural hidrófoba.

La figura 6 presenta la estructura de análogos de RANTES sintéticos preferidos. En la figura, NNY = nonaoilo, X = aminoácido codificado de forma no natural que tiene una cadena lateral hidrófoba, pPEG y FA = ácido graso.

La figura 7 representa esquemáticamente la formación de un polímero de pPEG de cadena ramificada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para ampliar la técnica de la ligación química natural que permita la ligación de una gama más amplia de péptidos, polipéptidos mediante un enlace amida. Se dan a conocer los procedimientos y las utilidades para dichas proteínas y proteínas modificadas. La invención resulta particularmente adecuada para la utilización en la síntesis de proteínas bioactivas sintéticas opcionalmente modificadas por polímero, y de composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas.

En detalle, el procedimiento de la invención proporciona una proteína sintética (especialmente una proteína que tiene un peso molecular del monómero superior a aproximadamente 25 kDa) que contiene un resto de pseudoaminoácido cuya cadena lateral tiene la fórmula: $-S-R_{aa}$, en la que R_{aa} es un fragmento del terminal opcionalmente sustituido de una cadena lateral de aminoácido especificado en el ribosoma, o un análogo del fragmento terminal de una cadena lateral de aminoácidos especificado en el ribosoma.

Específicamente, dicha proteína sintética tiene una actividad biológica poseída por una proteína bioactiva producida en el ribosoma.

El procedimiento proporciona además dichas proteínas sintéticas en las que una variedad de restos de aminoácidos de la proteína se unen a restos de aminoácidos adyacentes por un enlace amida.

Se dan a conocer dichas proteínas sintéticas en las que el resto de pseudoaminoácido es un resto de aminoácido con configuración D o es un resto de aminoácido con configuración L, o en el que dichas proteínas sintéticas contienen tanto resto(s) de pseudoaminoácido(s) en configuración D y resto(s) de pseudoaminoácido(s) en configuración L.

El procedimiento proporciona además, dichas proteínas sintéticas en las que el resto pseudoaminoácido se selecciona de entre el grupo constituido por una pseudoarginina; una pseudoasparagina; un pseudoaspartato; una pseudodopamina; un pseudoglutamato; una pseudoglutamina; una pseudohistidina; una pseudoisoleucina; una pseudoleucina; una pseudolisina; una pseudometionina; una pseudofenilalanina; una pseudoserina; una pseudotreonina; un pseudotriptófano; una pseudotirosina y una pseudovalina.

El procedimiento proporciona además dichas proteínas sintéticas en las que la proteína bioactiva especificada en el ribosoma es una proteína de mamífero (por ejemplo, una proteína humana, de simio, bovina, murina, porcina, ovina o equina).

El procedimiento proporciona además dichas proteínas sintéticas en las que la proteína tiene una bioactividad seleccionada de entre un receptor de proteína o un fragmento del mismo, de un ligando receptor de proteína o un fragmento del mismo o de una citocina (especialmente en el que la citocina se selecciona de entre el grupo constituido por una interleucina, una lincocina, una proteína RANTES, una proteína estimulante de la eritropoyesis, un factor de necrosis tumoral (FNT) un interferón, un factor de crecimiento y una hormona de un solo péptido).

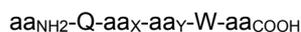
Se dan a conocer las proteínas sintéticas SEP-0, SEP-1 y SEP-3.

Se dan a conocer todas las proteínas sintéticas mencionadas en las que uno o más de sus restos de aminoácido están modificadas por uno o más aductos de polímero, y particularmente en las que la proteína sintética comprende uno o más restos de aminoácidos que están modificados por uno o más aductos de polímero en el/los resto(s) de aminoácidos que corresponden por lo menos uno de los puntos de glucosilación de una proteína bioactiva codificada por ribosomas.

Se da a conocer una composición farmacéutica con moléculas homogéneas que comprende una proteína sintética, en la que la proteína posee una actividad biológica que imita una actividad biológica asociada a una proteína de mamífero bioactiva especificada en el ribosoma, y tiene un peso molecular del monómero superior a aproximadamente 25 kDa, y contiene un resto de pseudoaminoácido cuya cadena lateral tiene la fórmula: $-S-R_{aa}$, en la que R_{aa} se selecciona de entre el grupo constituido por un fragmento terminal opcionalmente constituido de una cadena lateral de aminoácidos especificada en el ribosoma, o un análogo de la misma.

Se da a conocer un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección humana, que comprende administrar a un individuo necesitado de dicho tratamiento una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una o más composiciones farmacéuticas de moléculas homogéneas comprendiendo cada una, una proteína sintética, en la que la proteína sintética tiene un peso molecular del monómero superior a aproximadamente 25 kDa y contiene un resto de pseudoaminoácido cuya cadena lateral tiene la fórmula: $-S-R_{aa}$, en la que R_{aa} se selecciona de entre el grupo constituido por una fracción terminal opcionalmente sustituida de una cadena lateral de aminoácidos especificada en el ribosoma, o un análogo de la misma; presentando la proteína sintética una actividad biológica que imita una actividad biológica de un receptor de la proteína humana bioactiva especificada en el ribosoma o un fragmento del mismo, un ligando receptor de proteína o un fragmento del mismo, o una citocina.

La invención proporciona un procedimiento para sintetizar un polipéptido deseado, y el polipéptido deseado se prepara mediante dicho procedimiento, en el que el polipéptido deseado tiene la fórmula:



en la que Q y W indica la presencia opcional de uno o más restos de aminoácidos adicionales, aa_{NH_2} indica el resto de aminoácido con terminal N del polipéptido; aa_x y aa_y indican restos de aminoácidos adyacentes internos que tienen las cadenas laterales x e y, respectivamente, y en la que aa_y es un resto de aminoácido no especificado ribosómicamente y aa_{COOH} indica el resto de aminoácido con terminal C del polipéptido; comprendiendo el procedimiento:

(A) ligar un primer polipéptido que tiene la fórmula: $aa_{NH_2}-Q-aa_x-COSR$, en la que R es cualquier grupo compatible con el grupo tioéster, que comprende de manera no limitativa arilo, bencilo y grupos alquilo, a un segundo péptido que tiene la fórmula: $Cys-W-aa_{COOH}$, para formar de este modo el polipéptido: $aa_{NH_2}-Q-aa_x-Cys-W-aa_{COOH}$; y

(B) incubar el polipéptido en presencia de un reactivo $R_{aa}-X$, en la que $R_{aa}-X$ se selecciona de entre el grupo constituido por $X-CH_2COOH$, $X-(CH_2)_2COOH$, $X-(CH_2)-C(O)NH_2$, $X-CH_2OH$, $X-CHOHCH_3$, $X-CH_2CHOHCH_3$, $X-CH_2CH_2OH$, $X-(CH_2)_2NH-PG$, $X-CH_2NH-C(NH_2)_2$, $X-(CH_2)_2NH-C(NH_2)_2$, $X-CH_2CH_3$, $X-CH_2\phi$, $X-\phi-OH$ (para), $X-CH_2\phi-OH$ (para), $X-CH_2\phi-OPO_3$ (para), $X-CH_2-\phi-(OH)_2$ (meta para), $X-CH(COOH)_2$, $X-CH_2-IM-PG$, $X-CH-(CH_3)_2$, $X-CH_2CH-(CH_3)_2$, $X-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$, $X-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$, en la que X es I o Br, y $X-\phi$, en la que X es F, y $X-CH_2-IN$, en la que X es F, I o Br, en la que ϕ indica un grupo bencilo, *IN* indica un grupo indol, *IM* indica un grupo imidazol y *PG* indica un grupo protector; siendo la incubación en condiciones suficientes para formar el polipéptido deseado.

La invención proporciona además la forma de realización de dicho procedimiento, en la que el resto de aminoácidos aa_y se selecciona de entre el grupo constituido por una pseudoasparagina; un pseudoaspartato; unaseudodopamina; unseudoglutamato; unaseudoglutamina; unaseudohistidina; unaseudoisoleucina; unaseudoleucina; unaseudolisina; unaseudometionina; unaseudofenilalanina; unaseudoserina; unaseudotreonina; unseudotriptófano; unaseudotirosina y unaseudovalina.

Descripción de las formas de realización preferidas

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para ampliar la técnica de la ligación química natural que permita la ligación de una gama más amplia de péptidos, polipéptidos mediante un enlace amida,

facilitando de este modo la síntesis química de dichas moléculas. Se dan a conocer los procedimientos y utilizaciones para dichas proteínas y proteínas modificadas. La invención es particularmente adecuada para su utilización en la síntesis de proteínas bioactivas sintéticas, opcionalmente modificadas con polímero, que presentan preferentemente un peso molecular superior a aproximadamente 25 kDa, y de composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas.

I. Síntesis química de péptidos y proteínas bioactivos

Por lo general, la síntesis de péptidos y proteínas bioactivos utiliza el protocolo de síntesis de péptidos en fase sólida paso a paso de la química "Merrifield" desarrollado al principio de los años 1960, utilizando sintetizadores de péptidos automatizados convencionales. Dichas síntesis puede utilizar estrategias de ligación en fase sólida o en solución. Aunque dicha química puede utilizarse fácilmente para producir muchos polipéptidos, es inadecuada para la producción de proteínas o de grandes polipéptidos debido a las pérdidas de rendimiento asociadas, a la producción de subproductos y a reacciones incompletas. Para estudiar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas de ligación química que permiten a uno ligar fragmentos de péptidos preformados a fin de conseguir la síntesis de polipéptidos y proteínas mayores.

La ligación química implica la formación de un enlace covalente selectivo entre un primer componente químico y un segundo componente químico. Los grupos funcionales, interreactivos, exclusivos, presentes en los primer y segundo componentes pueden utilizarse para hacer quimioselectiva la reacción de ligación. Por ejemplo, la ligación química de péptidos y polipéptidos conlleva la reacción quimioselectiva de segmentos de péptidos o polipéptidos que son portadores de restos de aminoácidos con terminal C y terminal N, interreactivos, exclusivos y compatibles. Se han utilizado diferentes químicas con este fin, cuyos ejemplos incluyen ligación química natural (Dawson *et al.*, *Science* (1994), 266:776-779; Kent *et al.*, documento WO 96/34878; Kent *et al.*, documento WO 98/28434), ligación química formadora de oxima (Rose, *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* (1994), 116:30-34), ligación formadora de tioéster (Schnölzer, *et al.*, *Science* (1992), 256:221-225), ligación formadora de tioéter (Englebretsen, *et al.*, *Tet. Letts.* (1995), 36(48):8871-8874), ligación formadora de hidrazona (Gaertner, *et al.*, *Bioconj. Chem.* (1994), 5(4):333-338), y ligación formadora de tiazolidina y ligación formadora de oxazolidina (Zhang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998), 95(16):9184-9189; Tam, *et al.*, documento WO 95/00846; patente US nº 5.589.356) o por otros procedimientos (Yan, L. Z. y Dawson, P. E., "Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization," *J. Am. Chem. Soc.*, 2001; 123, 526-533; Gieselnan, *et al.*, *Org. Lett.*, 2001, 3(9):1331-1334; Saxon, *et al.*, "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds., *Org. Lett.*, 2000, 2, 2141-2143).

Cuando la ligación implica el acoplamiento de un polipéptido que posee un resto de cisteína con terminal N, se utiliza preferentemente el procedimiento de ligación química natural (Dawson *et al.*, *Science* (1994), 266:776-779; Kent *et al.*, documento WO 96/34878; Kent *et al.*, documento WO 98/28434; solicitud de patente US nº de serie 09/097.094). La ligación química natural implica una reacción quimioselectiva entre un primer segmento de péptido o polipéptido que tiene un resto de α -carboxitioéster en el terminal C y un segundo péptido o polipéptido que tiene un resto de cisteína en el terminal N. Una reacción de intercambio de tiol proporciona un intermedio unido al tioéster inicial, que espontáneamente se reconfigura para proporcionar un enlace amida natural en el punto de ligación a la vez que regenera el tiol de la cadena lateral de cisteína. En muchos casos, la secuencia de la proteína natural comprenderá restos de cisteína colocados de manera adecuada de modo que los fragmentos de polipéptido que tiene un resto de cisteína en el terminal N pueden sintetizarse y utilizarse en una reacción de ligación química natural.

Aunque esta metodología ha demostrado ser práctica, robusta y útil para la síntesis de polipéptidos largos y proteínas, sus requisitos para un resto de cisteína en el punto de ligación limitan su aplicación. La cisteína es uno de los aminoácidos menos comunes. Un dominio de proteína típico comprende 150 a 200 aminoácidos; muchas proteínas contienen regiones de más de 60 aminoácidos de longitud que no contienen ningún resto de cisteína. Una solución a este problema implica diseñar una proteína no natural en la que uno o más de los restos de aminoácidos naturales de la proteína se han reemplazado con restos de cisteína, permitiendo así que se utilice el procedimiento de ligación química natural. Esta solución es con frecuencia complicada por los efectos impredecibles que la introducción de un resto de cisteína puede tener sobre la estructura o función de la proteína. Dichos restos de cisteína pueden utilizarse para inmovilizar por enlace covalente la proteína sintetizada.

Se dan a conocer dos soluciones alternativas para este problema que pueden utilizarse por separado o conjuntamente. La primera de dichas soluciones (denominada en la presente memoria "ligación química seudonatural") implica la utilización de restos de pseudoaminoácidos no naturales en posiciones preseleccionadas en los péptidos utilizados en la síntesis de proteínas. Las estructuras de dichos pseudoaminoácidos imitan tanto las estructuras de cisteína como las estructuras de los aminoácidos que se encuentran de forma natural en dichas posiciones preseleccionadas en la proteína que se está sintetizando. La segunda de dichas soluciones (denominada en la presente memoria "ligación química natural prolongada") se describe en la solicitud de patente US nº de serie 60/231.339 (Kent, *et al.*, presentada el 8 de Setiembre de 2000), e implica ligar un primer componente que comprende un tioéster de carboxilo, y más preferentemente un tioéster de α -carboxilo con un segundo componente que comprende un ácido N-sustituido estable, y preferentemente, Na-sustituido, alquil amino o aril tiol con cadena de 2 ó 3 carbonos.

A. Ligación química seudonatural

La ligación química seudonatural se refiere a la tioalquilación de las cadenas laterales de cisteína generadas en los puntos de enlace procedentes de la ligación química natural. Un aspecto preferido es la tioalquilación de los puntos de ligación de la cisteína en la que por lo menos un péptido contiene una cisteína natural que tiene su cadena lateral de tiol protegida con un grupo protector adecuado.

El resto tiol de un grupo de cisteína se modifica en una cadena lateral deseada, por ejemplo, en la cadena lateral de un aminoácido especificado en el ribosoma, un análogo de dicho aminoácido, o en un aminoácido no especificado en el ribosoma. Tal como se utiliza en la presente memoria, un aminoácido especificado en el ribosoma es un aminoácido que es reconocido por ribosomas en el proceso de la traducción de la proteína y puede incorporarse en una proteína producida en el ribosoma. Existe considerable bibliografía publicada que describe modificaciones químicas del resto tiol de la cadena lateral de cisteína (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Protein Science", editado por: John E. Colligan *et al.*, John Wiley & Sons, NY (2000)). Kaiser, E.T. ha descrito la conversión de las cadenas laterales con resto de cisteína para imitar las propiedades químicas de una cadena lateral de aminoácidos naturales (véase, por ejemplo, Kaiser, E.T. *et al.*, "Chemical Mutation of Enzyme Active Sites", *Science*, 2 de Noviembre de 1984; 226(4674):505-11). Además, se ha descrito la utilización de una cadena lateral de cisteína para introducir un marcador en un péptido o proteína. Las modificaciones en la cadena lateral de cisteína se estudian en Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, S.S. Wong, (1991, CRC Press); Chemical Modification of Proteins, Gary E; Means *et al.*, (1971, Holden-Day), Chemical Modification of Proteins: Selected methods and analytical procedures, Glazer, A. N. *et al.* (1975, Elsevier); Chemical Reagents for Protein Modification, R. L. Lundblad (1991, CRC Press). Tam *et al.* (Biopolymers, (1998), 46:319-327) han dado a conocer la utilización de homocisteína (-CH₂-CH₂-SH) para la ligación química no cys natural, seguido de tioalquilación utilizando p-nitrobencenosulfonato de metilo (reactivo de metilación) para convertir la cadena lateral de homocisteína en una cadena lateral de metionina natural (-CH₂-CH₂-S-CH₃). Según la presente invención es necesario utilizar grupos protectores para evitar la destrucción de las cisteínas naturales implicadas en el emparejamiento de disulfuro por péptidos que contienen por lo menos una cisteína natural que no se desea convertir. Los grupos protectores adecuados se describen a continuación.

Aunque el método de ligación química seudonatural no facilita la simulación de las cadenas laterales de determinados aminoácidos especificados en el ribosoma (por ejemplo, las cadenas laterales de glicina, alanina, valina y prolina) (la cadena lateral de alanina puede formarse, sin embargo, por una reacción de desulfuración (Yan, L. Z. y Dawson, P. E., "Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization", *J. Am. Chem. Soc.*, 2001; 123, 526-533), puede utilizarse para formar cadenas laterales que imitan muchos aminoácidos especificados en el ribosoma o no codificados. Los aminoácidos producidos según el procedimiento de la ligación química seudonatural de la presente invención contendrán un enlace tioéter, y no presentarán ninguna ramificación en beta (porque todos incluirán un grupo metilo en la posición beta, es decir, aa-βCH₂-S-. De este modo, se puede conferir a las versiones del pseudoaminoácido de los aminoácidos ramificados en beta, isoleucina y treonina la estructura de la cadena lateral pendiente, sin que tengan la geometría beta y sus limitaciones inherentes.

De manera significativa, los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse para formar cadenas laterales de aminoácidos que tienen la misma longitud que la de los aminoácidos especificados en el ribosoma, o son más largas o más cortas que dicha longitud. Dicha alteración en la longitud de la cadena lateral puede utilizarse para estabilizar (o desestabilizar) la configuración tridimensional para aumentar la estabilidad de la proteína (o para aumentar la capacidad de la proteína para alterar su configuración) y de este modo aceptar un intervalo diferente de sustratos, inhibidores, receptores, ligandos, etc. En comparación con los aceptados por la proteína natural. Por ejemplo, Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-COOH da Cys-CH₂-S-CH₂-COOH (dicho "seudoácido glutámico" tiene un átomo adicional en la cadena lateral, a saber un grupo -S-; alternativamente, si se utiliza en lugar del ácido aspártico, poseerá dos átomos adicionales en la cadena lateral, es decir un grupo -CH₂-S-). Otras cadenas laterales tienen el mismo número de átomos en la cadena lateral, pero se diferencian por la inclusión del enlace tioéter (-S-). Por ejemplo, Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-CH₂-NH-PG, seguido por la eliminación de GP da Cys-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH₂. La estructura resultante no tiene átomos adicionales en la cadena lateral, pero un grupo-CH₂- se reemplaza con -S-. La metionina es otro ejemplo en la presente memoria, Cys-CH₂-SH + I-CH₂-CH₃ da Cys-CH₂-S-CH₂-CH₃ (frente a la estructura con met natural de Met-CH₂-CH₂-S-CH₃). De este modo el tioéter se vuelve a situar. La arginina también: Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-NH-CH((-NH₂)(=NH₂⁺)) da Cys-CH₂-S-CH₂-NH-CH((-NH₂)(=NH₂⁺)). Preferentemente, puede utilizarse la protección de los grupos aminoreactivos, particularmente para construir pseudolisina para evitar reacciones secundarias indeseadas. Una vez se lleva a cabo la reacción de tioalquilación, el grupo protector puede eliminarse.

En general, cuando se desea imitar una proteína natural tan estrechamente como sea posible, resulta más preferida la utilización de una molécula de pseudoaminoácido que tiene una longitud de la cadena lateral que es la misma longitud que la del aminoácido especificado en el ribosoma normalmente presente en dicha posición en la proteína; resulta todavía menos preferido utilizar una molécula de pseudoaminoácido que tiene una longitud de cadena lateral que es la de un átomo más larga que la de un aminoácido especificado en el ribosoma, y resulta todavía menos

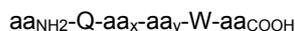
preferido utilizar una molécula de pseudoaminoácido que tiene una longitud de la cadena lateral que es dos átomos más larga que la de un aminoácido especificado en el ribosoma. Además, resulta preferido seleccionar un punto de ligación de la cisteína que está en una posición en la que los cambios genéticos no son probablemente para destruir la función o donde se conservan los aminoácidos en este punto en las proteínas relacionadas. Dichos puntos pueden ser identificados por exploración de alanina, modelado de homología y otros procedimientos.

En la ligación química seudonatural, un péptido que contiene un resto de cisteína en el terminal amino está ligado a un péptido que tiene un tioéster en el terminal carboxi, como en la ligación química natural. La cadena lateral con tiol de la cisteína se hace reaccionar a continuación con un compuesto de fórmula $R_{aa}-X$, en la que X es un buen grupo saliente, y R_{aa} es un grupo cuya estructura imita la parte terminal de la cadena lateral de un aminoácido especificado en el ribosoma o sintético.

De manera significativa, las reacciones de la ligación química seudonatural actúan con la configuración L natural de la cadena lateral con cisteína, o con la configuración D. La utilización de la configuración D puede proporcionar resistencia a la proteasa en el punto de ligación, y de este modo puede ser deseable cuando se desea aumentar la estabilidad a la proteólisis. Sin embargo, al utilizar la D-cisteína, puede alterarse la estructura del eje central en este lado. Dicha alteración, además de resistencia a la proteasa, puede desearse para alterar la bioactividad. Sin embargo, para minimizar el impacto sobre la bioactividad, se prefiere colocar la D-cisteína en el punto de alta flexibilidad, tal como una zona desordenada, tal como en el bucle desordenado que estará situado sobre la superficie de la molécula plegada resultante, en un terminal desordenado de la molécula. De manera deseable, las reacciones de ligación química seudonatural pueden utilizarse para colocar grandes cadenas laterales con carga (por ejemplo, las cadenas laterales de Lys, Arg, Asp o Glu) sobre la superficie de la molécula sintetizada.

Los ejemplos de buenos grupos salientes adecuados, X, incluyen los halógenos, especialmente el yodo y el bromo. Los ejemplos de grupos R_{aa} incluyen grupos PO_4 , COOH, COO, $CONH_2$, guanidinio, amino, alquilo, alquilo sustituido, arilo, aril sustituido, imidazol, imidazol alquilado, indol o indol alquilados.

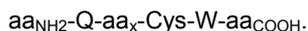
Para la selección para la que debe utilizarse R_{aa} dependerá de la cadena lateral de aminoácidos que se desea que esté presente en una posición determinada. De este modo, por ejemplo, un polipéptido o proteína deseados que tienen la secuencia de aminoácidos:



en la que Q y W indican cada uno la presencia o ausencia opcional de restos de aminoácidos adicionales, y aa_x y aa_y indican restos internos adyacentes (con las cadenas laterales x e y, respectivamente), y aa_{NH_2} y respectivamente indican el resto del terminal amino (N-) y el resto del terminal carboxi (C-) del polipéptido o proteína y se sintetiza preparando dos fragmentos peptídicos:



en la que Cys indica el reemplazamiento de aa_y por cisteína y R es cualquier grupo compatible con el grupo tioéster, que comprende de manera no limitativa, grupos arilo, bencilo y alquilo. Ejemplos de R incluyen tioésteres de 3-carboxi-4-nitrofenil, ésteres de bencilo y ésteres de ácido mercaptopropiónico y leucina (véase, por ejemplo, Dawson *et al.*, *Science* (1994), 266:776-779; Canne *et al.*, *Tetrahedron Lett.* (1995) 36:1217-1220; Kent *et al.*, documento WO 96/34878; Kent *et al.*, documento WO 98/28434; Ingenito *et al.*, *JACS* (1999), 121(49):11369-11374 y Hackeng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96: 10068-10073). Otros ejemplos incluyen ditiotreitol, o tioésteres de alquilo o arilo, que pueden ser producidos por técnicas biológicas mediadas por inteína, que también son bien conocidos (véase, por ejemplo, Chong *et al.*, *Gene* (1997), 192:277-281; Chong *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* (1998), 26:5109-5115; Evans *et al.*, *Protein. Science* (1998), 7:2256-2264 y Cotton *et al.*, *Chemistry & Biology* (1999), 6(9):247-256; y a continuación enlazando los fragmentos para formar:

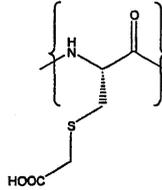


El fragmento ligado se hace reaccionar a continuación con $R_{aa}-X$, en la que R_{aa} es un grupo lateral que imita la estructura de la cadena lateral y. La reacción se lleva a cabo en condiciones suficientes para convertir el grupo tiol de la cisteína en una cadena lateral "seudoy". Por ejemplo, si R_{aa} se selecciona para ser CH_2-COOH o $(CH_2)_2-COOH$, entonces la reacción conducirá a la formación de un resto de aminoácido que imita la estructura y función del ácido aspártico ("seudoAsp") o ácido glutámico ("seudoGlu"). Como se apreciará a partir de la descripción anterior, puede realizarse una síntesis más complicada utilizando más de dos fragmentos peptídicos.

La ligación química natural que implica "seudoaminoácidos" según la presente invención amplía significativamente la aplicación del procedimiento de enlace químico natural para la síntesis química de proteínas. La ligación química natural que implica "seudoaminoácidos" utiliza la misma química en la etapa de ligación, formando un enlace péptido en el resto Cys con una funcionalidad de la cadena lateral que contiene tiol; en una única segunda etapa, la cadena lateral que contiene tiol natural de la Cys en el punto de ligación se convierte por reacción quimioselectiva para dar

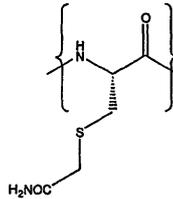
una cadena lateral no natural que contiene el mismo grupo funcional que un aminoácido codificado genéticamente, pero una cadena lateral no natural.

- 5 Por ejemplo, la cisteína en el punto de ligación puede hacerse reaccionar con ácido bromoacético (u otro ácido haloacético) a pH neutro en agua; solamente el tiol desprotegido del Cys en el punto de ligación reacciona en estas condiciones para proporcionar un polipéptido que contiene un resto de S-carboximetilado en el punto de ligación, es decir:

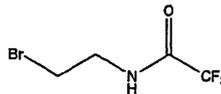


- 10 Este aminoácido no natural contiene un resto carboxilo en la cadena lateral, el mismo grupo funcional que un resto de ácido glutámico o de ácido aspártico. La Cys S-carboximetilada se denomina en la presente memoria un "ácido seudoglutámico" ("seudoglutamato", "seudoGlu") (donde está presente un átomo más de la cadena lateral y es el grupo -S- que forma un enlace tioéter) (también puede denominarse "ácido seudoaspártico" donde dos átomos más de la cadena lateral están presentes, uno de los cuales es el grupo -S- que forma un enlace tioéter). Para muchas proteínas, la simple conservación de la cadena lateral de carboxilato cargada, incluso en este "seudoaminoácido" será suficiente para conservar o proporcionar propiedades deseadas a la proteína. Una diferencia clave consiste en que funciona como punto de ligación química natural en una posición desprovista de una cisteína adecuada.

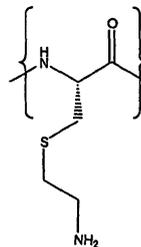
- 20 La utilización de otros reactivos para modificar el tiol de la cadena lateral en los restos Cys en el/los punto(s) de ligación puede proporcionar otros restos de "seudoaminoácido". Por ejemplo, la reacción del tiol con una haloacetamida, por ejemplo, bromoacetamida, dará una "seudoglutamina" en el punto de ligación, es decir:



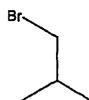
- 25 Asimismo, la reacción con una haloalquilamina N-protegida, por ejemplo,



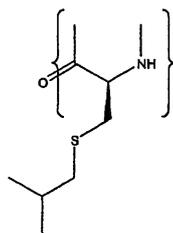
- 30 seguido de la eliminación del grupo protector amino dará un resto de "seudolisina", es decir:



- 35 Reacción del resto o de los restos de Cys en el/los punto(s) de ligación con un haloalcano adecuado, por ejemplo,

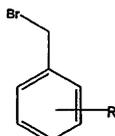


proporcionará un aminoácido "seudoleucina", es decir:



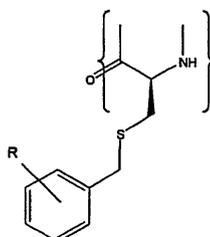
Otros haluros que contienen arilo seleccionados de forma adecuada, en los que R puede ser H, OH, arilo, etc., por ejemplo,

5



pueden utilizarse asimismo para generar pseudoaminoácidos correspondientes a los residuos Phe, Tyr o Trp, es decir:

10



Una característica significativa de este método es que los restos de cisteína que no se desean modificar en los segmentos reaccionantes estén protegidos en la cadena lateral, por ejemplo, como Cys(Acm), para evitar la modificación química de otros restos de Cys distintos de uno(s) en el/los punto(s) de ligación, o que cualesquier otros restos de Cys en los segmentos reaccionantes se proponen para la formación simultánea de "pseudoaminoácidos" idénticos por la reacción de modificación química tras la ligación. Se apreciará que los mismos principios se apliquen a la utilización de homocisteína en el punto de ligación. Se apreciará además que pueda utilizarse selenocisteína en el punto de ligación aunque la ligación química natural mediada por selenocisteína, y convertida por reacciones de alquilación similares para generar pseudoaminoácidos de la invención, cuando un grupo selenoéter reemplaza al grupo tioéter.

15

20

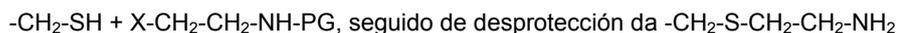
Tal como se utiliza en la presente memoria, el símbolo ϕ indica un grupo bencilo; *IM* indica un grupo imidazol e *IN* indica un grupo indol; *GP* indica un grupo protector. A continuación hay un resumen de grupos laterales con R_{aa} que pueden utilizarse para sintetizar péptidos que contienen restos de pseudoaminoácido según la presente invención donde X es un halógeno (I, Br, Cl, F, con I y Br preferidos para la mayoría, y F preferido para el acoplamiento en ϕ):

25

Aminoácidos básicos:

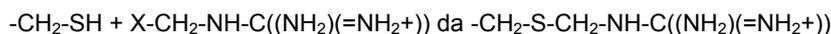
30

Lys (sin átomos extra)



Arg (sin átomos extra)

35



His (2 átomos extra)

40



Aminoácidos ácidos:

Asp (2 átomos extra)

45

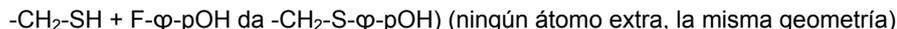


Glu (1 átomo extra)



5 Aminoácidos ácidos polares sin carga:

Tyr (ninguno o 1 átomo extra)

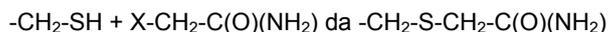


10



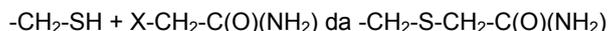
Gln (1 átomo extra)

15



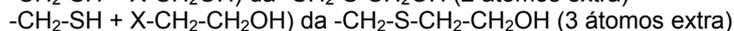
Asn (2 átomos extra)

20



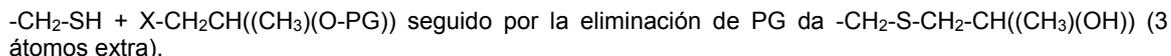
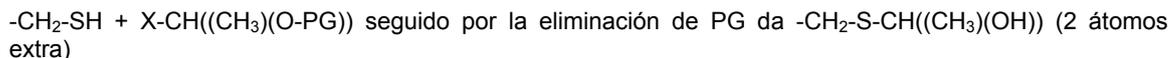
Ser (2 ó 3 átomos extra)

25



Thr (2 ó 3 átomos extra, desapareciendo la ramificación en beta)

30



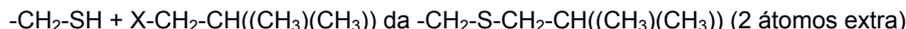
35 Aminoácidos apolares:

35

Leu (1 ó 2 átomos extra)

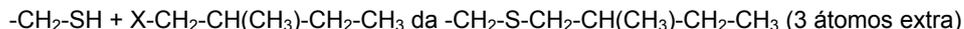
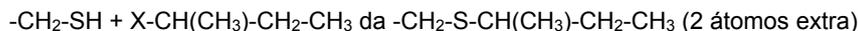


40



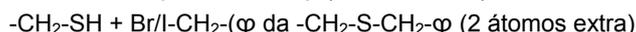
Ile (2 ó 3 átomos extra, desapareciendo la ramificación en beta)

45



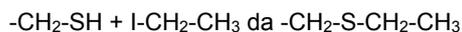
Phe (1 ó 2 átomos extra)

50



Met (sin átomos extra)

55



Trp (1 átomo extra)

60



La reacción general de ligación pseudoquímica se ilustra en la figura 1. Los grupos R_{aa} y X pueden utilizarse para formar pseudoaminoácidos preferidos como se muestra en la Tabla I. Los restos se presentan inalterados, sin embargo, se apreciará que los grupos ionizables tales como NH_2 o COOH puedan estar en su forma cargada o proporcionados como sales. Todas las reacciones excepto las utilizadas para formar seudolisina son acuosas y se

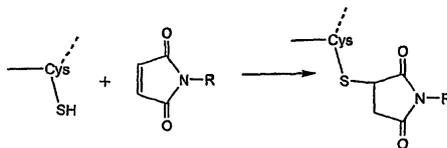
llevan a cabo a un pH entre 8 y 9, donde la estequiometría y la optimización de las reacciones pueden ajustarse siguiendo protocolos normalizados. La seudolisina se forma en una reacción acuosa llevada a cabo a pH entre 8 y 9, seguido de reacción en piperidina/H₂O (ácido trifluoroacético (TFA)).

Tabla I			
Reactivo R _{aa} -X	Producto de reacción	Seudoaminoácido	Simulaciones o sustituciones
X-CH ₂ COOH (X= I, Br)		SeudoAsp (+ 2 átomos) SeudoGlu (+ 1 átomo)	Ácido aspártico Ácido glutámico
X-(CH ₂) ₂ COOH (X= I, Br)		SeudoGlu (+ 2 átomos)	Ácido glutámico
X-(CH ₂) ₂ -C(O)NH ₂ (X= I, Br)		SeudoGln (+ 1 átomo) SeudoAsn (+ 2 átomos)	Glutamina Asparagina
X-CH ₂ OH (X= I, Br)		SeudoSer (+ 2 átomos)	Serina
X-CHOHCH ₃ (X= I, Br)		SeudoThr (+ 2 átomos)	Treonina
X-CH ₂ CHOHCH ₃ (X= I, Br)		SeudoThr (+ 3 átomos)	Treonina
X-CH ₂ CH ₂ OH (X= I, Br)		SeudoSer (+ 3 átomos)	Serina
X-(CH ₂) ₂ NH-PG (X= I, Br)		SeudoLys	Lisina
X-CH ₂ NH-C(NH ₂) ₂ (X= I, Br)		SeudoArg	Arginina
X-(CH ₂) ₂ NH-C(NH ₂) ₂ (X= I, Br)		SeudoArg (+ 1 átomo)	Arginina
X-CH ₂ CH ₃ (X= I, BR)		SeudoMet	Metionina
X-Φ (X=F)		SeudoPhe (+ 1 átomo)	Fenilalanina
X-CH ₂ Φ (X= I, BR)		SeudoPhe (+ 2 átomos)	Fenilalanina
X-Φ-OH (PARA) (X=I, BR)		SeudoTyr	Tirosina
X-CH ₂ Φ-OH (PARA) (X= I, BR)		SeudoTyr (+ 1 átomo)	Tirosina
X-CH ₂ Φ-OPO ₃ (PARA) (X= I, BR)		SeudoFosfo-Tyr	Fosfotirosina
X-CH ₂ Φ-(OH) ₂ (META PARA) (X= I, BR)		SeudoDopa	Dopamina
X-CH(COOH) ₂ (X= I, BR)		SeudoGla	Ácido γ-carboxi-glutámico
X-CH ₂ -IM-PG (X= I, BR)		SeudoHis	Histidina
X-CH ₂ -IN (X= F, I, BR)		SeudoTrp	Triptófano
X-CH-(CH ₃) ₂ (X=1, BR)		SeudoLeu (+ 1 átomo) SeudoVal (+ 2 átomos)	Leucina Valina
X-CH ₂ CH-(CH ₃) ₂ (X= I, BR)		SeudoLeu (+ 2 átomos)	Leucina
X-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃ (X= I, BR)		Seudolle (+ 2 átomos)	Isoleucina
X-CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃ (X= I, BR)		Seudolle (+ 3 átomos)	Isoleucina

5 El grupo tiol del resto de cisteína puede oxidarse (-SH → -SO₃) o reemplazarse con oxígeno para formar serina (-SH → -OH). Dicho reemplazamiento puede llevarse a cabo haciendo reaccionar la cisteína con tosil-Cl (Tos-Cl) convirtiendo de este modo el grupo tiol, -SH, en un grupo -S-Tos. En presencia de base fuerte, OH reemplaza el sustituyente de Tos, formando de este modo el grupo -OH deseado.

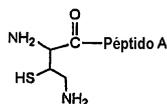
10

Además, el grupo tiol de la cisteína puede modificarse mediante una reacción de adición de Michael, como se muestra a continuación:

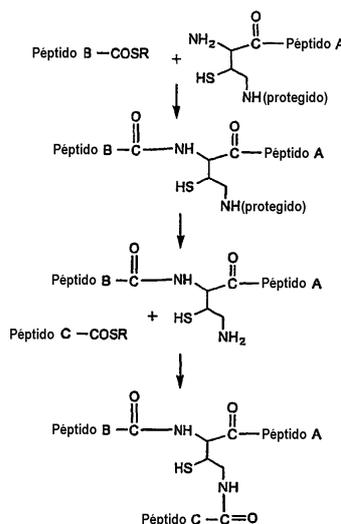


5 en la que R es H, alquilo, arilo, alquilarilo, amino o es una molécula de polímero, que puede ramificarse o no ramificarse, al azar o bloquearse.

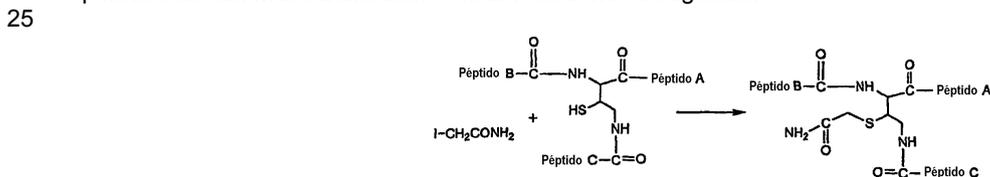
10 Otro aspecto se refiere a la utilización de un fragmento de péptido cuyo resto de cisteína del terminal amino se ha modificado para que contenga un resto alquilamino (y preferentemente un metilamino):



15 Protegiendo el grupo amino del resto alquilamino se puede ligar el péptido A a un segundo péptido de fórmula general: Péptido B- α COSR. Durante la eliminación del grupo protector, un péptido adicional que tiene la fórmula general: Péptido C- α COSR puede ligarse a los péptidos anteriormente ligados para formar un complejo peptídico ramificado:



20 Ya que la proteína ramificada contiene todavía el grupo tiol de la cisteína, reaccionará con una molécula de R_{aa} -X de la manera descrita anteriormente, para permitir de este modo más modificaciones de la cadena lateral. En particular, utilizando una alquilamida como sustituyente R, un grupo amino adicional puede introducirse en la molécula, permitiendo así más ramificación o más reacciones de ligación:



30 La modificación de la cadena lateral de cisteína puede utilizarse para introducir alguno de una variedad de marcadores o moléculas de enlace. Por ejemplo, pueden utilizarse los marcadores detectables por resonancia de espín electrónico, fluorescencia (por ejemplo, 4-cloro-7-sulfobenzo-furazan amonio (SBF) Pierce Chemical Co.) o detección por la imagen magnética. Dicho marcaje es útil en el diagnóstico de enfermedades y afecciones, así como en el análisis de interacciones moleculares (por ejemplo, para medir distancias en las proteínas de la membrana completa). La metodología de la presente invención tiene varias ventajas salientes con respecto a la utilización de marcadores y moléculas de enlace. Dichos sustituyentes pueden incorporarse en un punto específico, de manera no aleatoria. Además, el resto de marcador necesita solamente ser estable para las etapas de ligación química posteriores (si existen). Dichas reacciones se realizan generalmente en condiciones muy suaves (tales como las

utilizadas en la ligación química natural; eliminación de Acm u otros grupos protectores que pueden utilizarse opcionalmente para proteger los grupos tiol de otros restos de cisteína (como con $\text{Hg}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$); y purificación por HPLC en fase inversa). La protección de dichos grupos tiol adicional impide la polimerización oxidativa de los péptidos que contienen Cys y facilita así su purificación y manipulación.

5

II. Péptidos y proteínas bioactivos

A. Proteínas bioactivas sintéticas

10 Los procedimientos descritos anteriormente pueden utilizarse para sintetizar péptidos y proteínas bioactivos sintéticos. Tal como se utiliza en la presente memoria, una proteína bioactiva se dice que es "sintética" si se ha utilizado tecnología no recombinante para polimerizar alguno, y aún más preferentemente, todos sus restos de aminoácidos. La expresión "tecnología no recombinante" quiere decir que distingue las tecnologías que conllevan la química orgánica y otros métodos de polimerización sintéticos procedentes de tecnologías que implican la traducción del ARN en proteína, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Las proteínas bioactivas sintéticas se producirán *in vitro* utilizando los principios de la química orgánica, y en particular los procedimientos de "ligación química natural" tal como se expone en la presente memoria. Dicha síntesis química se realizará preferentemente utilizando un método de síntesis convergente en el que los fragmentos del polipéptido se sintetizarán y a continuación se ligarán uno con otro para formar la proteína bioactiva sintética. Alternativamente, las proteínas bioactivas sintéticas de la presente invención pueden sintetizarse en una sola síntesis no convergente.

20 Como se mencionó anteriormente, la proteína bioactiva sintética presenta un peso molecular considerable, siendo preferentemente superior a aproximadamente 25 kDa. En el contexto de la presente invención, dichas determinaciones de peso molecular deben hacerse por electroforesis desnaturante en poliacrilamida SDS. La expresión "peso molecular del monómero" hace referencia al peso molecular de una proteína sintética monomérica, que se distingue de las proteínas sintéticas que puede poseer múltiples copias de una proteína o polipéptido.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, una proteína sintética se dice que tiene "actividad biológica" si posee una bioactividad discernible que depende de la estructura de la proteína sintética o de la secuencia de aminoácidos, dicha variación en dicha estructura o secuencia aumenta, modifica o atenúa la bioactividad de la proteína. Sin limitación, dicha "actividad biológica" incluye la capacidad de la proteína para mediar una señalización catalítica o inducir la reacción. Tal como se utiliza en la presente memoria, una proteína se dice que "media una reacción catalítica" convirtiendo un sustrato en un producto sin consumirse la misma o modificarse permanentemente. Una proteína se dice que "media una señalización o que induce la reacción" si su presencia produce un organismo, o si sus tejidos o células, inician, continúan, aumentan, modifican o atenúan la expresión génica, la diferenciación celular o la proliferación celular. Los ejemplos de dichas reacciones de señalización o inducción incluyen inducir la expresión de citocinas o una respuesta a la expresión de citocinas, induciendo eritropoyesis, induciendo o atenuando la inflamación y/o un proceso inflamatorio, iniciando la angiogénesis o vascularización, induciendo apoptosis, afectando el ciclo celular, etc.

30 La bioactividad de las proteínas bioactivas sintéticas incluye además la capacidad de la proteína para unirse específicamente a un receptor, ligando o anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "enlace específico" hace referencia a una interacción de enlace basada estructuralmente, tal como la que existe entre una hormona y su receptor, o un anticuerpo y un epítipo antigénico, que se distingue del enlace "no específico" basado en la carga, solubilidad, hidrofobia, etc.

35 Las proteínas bioactivas sintéticas se sintetizan por condensación de restos de aminoácidos. Dichos restos de aminoácidos pueden ser el ácido nucleico codificado, los aminoácidos instalados en el ribosoma: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos seleccionada estará compuesta por, todo lo construido a partir de fragmentos de polipéptido que pueden contener un resto de cisteína en el terminal N en lugar de los restos de aminoácidos presentes en la secuencia natural de esta proteína. La inclusión de dicho resto permite que se ligue el polipéptido a otro polipéptido (modificado para contener un grupo carboxi tioéster) utilizando los principios de la ligación química natural descrita en la presente memoria, y, como tal, facilita la utilización de síntesis convergente para producir proteínas bioactivas sintéticas.

40 Las proteínas bioactivas sintéticas pueden contener restos de aminoácidos "irregulares". Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "restos de aminoácidos irregulares" pretende hacer referencia a los aminoácidos que no son codificados por el ARN y no están instalados en el ribosoma. Esto permite amplia selectividad y flexibilidad en el diseño y/o construcción de proteínas bioactivas sintéticas. Los ejemplos de aminoácidos no instalados en el ribosoma que pueden utilizarse según la presente invención incluyen: D-aminoácidos, β -aminoácidos, seudoglutamato, γ -aminobutirato, ornitina, homocisteína, aminoácidos sustituidos en N (R. Simon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992), 89:9367-71; documento WO 91/19735 (Bartlett *et al.*), patente US nº 5.646.285 (Baindur), ácidos α -aminometilenoacético (isómero del dipéptido aminoácido-Gly) y α -amino-oxiácidos, etc. Pueden utilizarse

65

análogos peptídicos que contienen tioamina, amida viníloga, hidrazino, metileno, tiometileno, fosfonamidas, oxiamida, hidroxietileno, amida reducida e isómeros de amida reducida sustituidos y β -sulfonamida(s).

En particular, presenta ventajas la utilización de pseudoglutamato ya que la modificación de la cadena R permite el acoplamiento de aductos del polímero a la proteína sintetizada. Asimismo, pueden utilizarse alquilo con cadena de 2 a 3 átomos de carbono o arilol aminoácidos α -sustituido en el terminal N. Dichos restos (cuando están presentes en el terminal final o en el polipéptido) pueden utilizarse de manera ventajosa para ligar este polipéptido a un polipéptido que tiene un resto de carboxi tioéster, según los procedimientos de ligación química natural prolongado descritos en la presente memoria.

Todos los restos de aminoácidos de la proteína bioactiva sintética pueden unirse por un enlace peptídico (es decir, un enlace amida). Se da a conocer que dos restos de aminoácidos pueden estar unidos uno a otro por un enlace no amídico (tal como un enlace de tioéster, un enlace de oxima, un enlace de tioéter, un enlace de disulfuro directo, un enlace de tiozolidina, etc.) (Schnölzer, M. y Kent, S.B.H., *Science* (1992), 256:221-225; Rose, K., *J. Amer. Chem. Soc.* (1994), 116: 30-33; Englebretsen, D.R. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 36: 8871-8874; Baca, M. *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* (1995), 117: 1881-1887; Liu, C.F. *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* (1994), 116: 4149-4153; Liu, C.F. *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* (1996), 118: 307-312; Dawson, P.E. *et al.*, (1994), *Science*, 266: 776-779). Esto permite aprovechar una variedad de modificaciones del enlace peptídico, sustituyentes y reemplazamientos isoestéricos en la preparación de proteínas bioactivas.

Las proteínas bioactivas sintéticas pueden concebirse para que presenten una bioactividad que imita una bioactividad asociada a una proteína de mamífero (incluyendo la especie humana, simios, bovina, murina, porcina, ovina, equina, etc.), aviar o de peces. Tal como se utiliza en la presente memoria, una primera proteína se dice que imita una segunda proteína si la primera proteína posee una bioactividad que está modificada, aumentada o atenuada con respecto a la bioactividad de la segunda proteína. Una bioactividad se dice que está "asociada" a la proteína si la presencia depende directa o indirectamente de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Las proteínas bioactivas pueden modificarse genéticamente total o parcialmente, sin referencia a ninguna contrapartida bioactiva natural correspondiente. Las proteínas bioactivas sintéticas preferidas de la presente invención incluyen receptores, ligandos de receptor de proteínas. Ejemplos de dichas proteínas incluyen el receptor de la hormona adrenocorticotrópica y sus fragmentos bioactivos, receptor de angiotensina, receptor natriurético auricular, receptor de bradiquinina, receptor de la hormona del crecimiento, receptor quimiotáctico, receptor de dinorfina, receptor de endorfina, receptor para β -lipotropina y sus fragmentos bioactivos, receptor de encefalina, receptores del inhibidor enzimático, receptor de fibronectina y sus fragmentos bioactivos, receptores del péptido que libera la hormona de crecimiento y gastrointestinales, receptor para el péptido de liberación de la hormona luteinizante, receptor para la hormona estimulante de melanocitos, receptor de neurotensina, receptor opiode, receptor de oxitocina, receptor de vasopresina, receptor de vasotocina, receptor para la hormona paratiroidea y fragmentos, receptor de la proteína cinasa, receptor de somatostatina y receptor de la sustancia P.

Las proteínas bioactivas sintéticas incluyen además enzimas, y moléculas estructurales tales como quitina o colágeno, etc.

Las proteínas bioactivas sintéticas incluyen citocinas. Las citocinas son pequeñas proteínas o factores biológicos (en el intervalo entre 5 y 20 kDa) que son liberados por las células y median efectos específicos en la interacción célula a célula, la comunicación y en el comportamiento de otras células. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "citocina" pretende incluir las interleucinas (IL) (tales como IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, etc.); linfocinas y moléculas de señalización tales como las proteínas estimulantes de la eritropoyesis (por ejemplo, eritropoyetina (EPO)), el factor de necrosis tumoral (FNT), interferones, etc., factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante, el factor de crecimiento de nervios, el factor de crecimiento procedente del cerebro, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de linfocitos T (TGF, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, etc.), factores estimulantes de colonias (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, etc.), factor de crecimiento epidérmico (EGF, LIF, KGF, OSM, PDGF, IGF-1, etc.), factor de crecimiento de fibroblastos (α FGF, β FGF, etc.), y hormonas, particularmente hormonas peptídicas individuales, tales como la hormona de crecimiento).

Las citocinas, y particularmente las citocinas quimiotácticas, comprenden también ejemplos particularmente preferidos de proteínas cuyas secuencias de aminoácidos pueden utilizarse para ayudar en el diseño de proteínas bioactivas sintéticas. Las citocinas participan en respuestas inmunitarias innatas y adquiridas mediante la mediación directa o indirecta de la regeneración de leucocitos, o actuando como señales importantes en la activación de leucocitos que se han acumulado en puntos específicos de la invasión microbiana. Las citocinas proinflamatorias, interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) y mediadores reflejan la regeneración y activación neutrófila, incluyendo la molécula de adhesión intercelular soluble, interleucina-8 (IL-8) (Kotecha S., *European Journal of Pediatrics* (1996), 155 Supl. 2:S14-17). La interleucina-6 es una citocina multifuncional principalmente implicada en la respuesta en fase aguda, la diferenciación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. (Akira S. *et al.*: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* (1993), 54: 1-78). Esta citocina es sintetizada y segregada por muchas células diferentes, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células endoteliales y fibroblastos. IL-

- 6 se induce con frecuencia con las citocinas proinflamatorias FNT-alfa e IL-1 en muchas condiciones de alarma, y la IL-6 circulante desempeña una función importante en la inducción de reacciones en fase aguda, (Xing Z. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, (1998), 101(2): 311-20). Las citocinas que influyen directa o indirectamente tanto en la regeneración como en la activación de leucocitos incluyen FNT-alfa, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y miembros de la familia de las quimiocinas. Las citocinas que regulan principalmente el estado de activación de leucocitos incluyen interferón- γ (IFN- γ), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-12 (IL-12): Las citocinas pueden influir además en la eliminación microbiana induciendo o regulando la expresión de otras moléculas efectoras, que pueden ocurrir de manera autocrina o paracrina.
- Los factores estimulantes de colonias son citocinas producidas por una variedad de células mieloides y del estroma que se necesitan para la proliferación y maduración de las células madre hematopoyéticas. Además, los estudios demuestran que estos factores aumentan las actividades de las células efectoras de las poblaciones de leucocitos maduros. Específicamente, G-CSF prolonga la supervivencia de los neutrófilos *in vitro*, aumenta la actividad fagocítica de los neutrófilos y aumenta la alergia de los neutrófilos. (Standiford, T.J., *et al.*, *J. Invest. Med.* (1997), 45:335-345). En cambio, GM-CSF favorece la proliferación y maduración tanto de neutrófilos como de macrófagos; las propiedades de activación de esta citocina están dirigidas principalmente hacia las poblaciones de macrófagos maduros. (Cheng, G.H., *et al.*, *J. Immunol.* (1994), 152: 724-734).
- Seis subfamilias íntimamente relacionadas de citocinas quimiotácticas, denominadas quimiocinas, han sido caracterizadas actualmente. De éstas, los miembros de por lo menos dos subfamilias contribuyen a la defensa del hospedador antimicrobiano pulmonar (Mandujano J., *et al.*, *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* (1995), 155:1233-1238; Baggiolini M., *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* (1997) 15:675-705). Los miembros de la familia de quimiocinas C-X-C, que incluyen IL-8, MIP (proteína inflamatoria de macrófagos)-2, KC, ENA-78 y NAP-2, tienen actividades estimulantes y quimiotácticas de neutrófilos predominantes, mientras que la familia C-C, que incluye MCP (proteína quimiotáctica de monocitos)-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alfa y MIP-1 beta, ejerce efectos quimiotácticos y/o activadores predominantes sobre macrófagos, linfocitos y eosinófilos. (Huffnagle G.B., *et al.*, *The Role of Chemokines in Pneumonia*, in Koch A, Strieter R, eds., *Chemokines in Disease*. Texas. R. G. Landis Co.; 1996:151-168).
- El interferón-gama es una citocina producida por los linfocitos T (tanto los linfocitos T alfa, beta y gama delta) y las células NK que es instrumental en la inmunidad mediada por células contra un amplio espectro de patógenos pulmonares. Esta citocina activa varias funciones de células efectoras de macrófagos, incluyendo la estimulación de la alergia, la capacidad para presentar el antígeno, el cebado de la liberación de FNT procedente de macrófagos y la actividad antimicrobiana de macrófagos aumentada *in vitro* contra organismos bacterianos, fúngicos y microbacterianos.
- La interleucina-12 es una citocina que favorece las respuestas inmunitarias de tipo Th1, a la vez que inhibe las respuestas inmunitarias de tipo Th2. Específicamente, IL-12 estimula el desarrollo de los linfocitos T, Th1 y de las células NK y aumenta la actividad citolítica de las células CD8+ y las células NK. Aún más importante, IL-12 sirve como el mayor inductor de IFN-gama procedente de los linfocitos T y de las células NK.
- En contraste con IL-12, IL-10 favorece el desarrollo de respuestas inmunitarias de tipo Th2, mientras que inhibe la inmunidad mediada por las células (de tipo Th1). (Howard M., *et al.*, *J. Clin. Immunol.* (1992), 12: 239-247). Esta citocina se demostró que ejerce potentes propiedades inflamatorias, en parte desactivando directamente neutrófilos y macrófagos y disminuyendo la expresión de FNT, IFN-gamma y los miembros tanto de las familias de quimiocinas C-X-C como de C-C. IL-10 es instrumental atenuando la producción indeseada de citocinas proinflamatorias en estados de activación generalizada de células inmunes.
- La EPO es un ejemplo particularmente preferido de una proteína cuya secuencia de aminoácidos puede utilizarse para ayudar en el diseño de una proteína bioactiva sintética con una actividad estimulante de eritropoyesis. La EPO es el principal factor responsable para la regulación de la producción de glóbulos rojos durante las condiciones en estado estacionario y para acelerar la recuperación de la masa de glóbulos rojos tras la hemorragia (Jelkmann, W. (1992) *Physiol. Reviews* 72:449; Krantz, S.B. (1991) *Blood* 77:419; Porter, D.L. y M.A. Goldberg (1993) *Exp. Hematol.*, 21:399; Nissenson, A.R. (1994) *Blood Purif.* 12:6). La forma circulante de la EPO humana es una glucoproteína de 165 aminoácidos (aa) con un peso molecular de aproximadamente 30.000 (Sawyer, S.T. *et al.* (1994), *Hematol. Oncol. Clinics NA* 8:895; Jacobs, K.J. *et al.*, *Nature* (1985), 313:806; Lin, F.K. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:7580). Aunque el ADNc para la EPO prevé una molécula con 166 restos de aminoácidos, la arginina del terminal carboxi se elimina en una modificación después de la traducción (12). Existen tres puntos potenciales para la glucosilación unida a N y todos están rellenos. Un resto de carbohidrato unido al O está también presente (13). Los efectos de la glucosilación son complejos. Aunque la EPO procedente de *E. coli* no glucosilada presenta actividad biológica completa *in vitro*, la glucosilación es aparentemente necesaria para la activación total *in vivo*. De este modo, La EPO natural, producida por *E. coli* y desglucosilada presenta muy poca actividad en estudios en animales (Krantz, S.B. (1991) *Blood* 77:419; Sasaki, H. *et al.* (1987), *J. Biol. Chem.*, 262:12059; Lowy, P.H. *et al.* (1960), *Nature*, 182:102; Wojchowski, D.M. *et al. Biochem. Biophys. Acta*, 910:224; Dordal, M.S. *et al.* (1985) *Endocrinology*, 116:2293).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los modelos de glucosilación variables, presentan efectos variables. Por ejemplo, la EPO desialada presenta tanto actividad aumentada *in vitro* como disminuida *in vivo*, un efecto atribuido a la exposición de restos de galactosa que están reconocidos, unidos y eliminados por hepatocitos (Spivak, J.L. y B.B. Hogans (1989) *Blood*, 73v:90; Goldwasser, E. *et al.* (1974) *J. Biol. Chem.* 249:4202). El modelo de ramificación de EPO completamente sialada también presenta una diferencia en la actividad biológica. Principalmente la EPO ramificada tetra-antennaria presenta actividad equivalente a la EPO "convencional", mientras que la EPO ramificada principalmente bi-antennaria presenta tres veces más actividad *in vitro* pero solamente 15% de actividad normal *in vivo* (Takeuchi, M. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:7819). Los estudios han indicado que solamente los azúcares unidos por N y no unidos por O, son importantes en el funcionamiento de la EPO (Higuchi, M. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 770319).

Los factores estimulantes de colonias y RANTES también comprenden ejemplos particularmente preferidos de proteínas cuyas secuencias de aminoácidos pueden utilizarse para ayudar al diseño de una proteína bioactiva sintética.

B. Proteínas y polipéptidos modificados por polímeros

La proteína o el polipéptido pueden modificarse para que contenga uno o más aductos de polímeros estructuralmente definidos en las posiciones preseleccionadas. Aunque las proteínas modificadas por polímeros se han descrito anteriormente, la naturaleza y manera de las posibles modificaciones de polímeros de la presente invención se diferencian notablemente de dichos esfuerzos anteriores.

Ya que las proteínas bioactivas sintéticas se sintetizan químicamente, en la totalidad o en parte, es posible sintetizar dichas proteínas de manera que permitan a los polímeros unidos por enlaces covalentes (tales como los polímeros o azúcar, polietilenglicol, glicoles, ácido hialurónico, etc.) a uno o más puntos seleccionados por el usuario y definidos por el usuario en un polipéptido un eje central de proteína. Además, la producción sintética de las proteínas permite asegurar que dichas modificaciones están presentes en cada uno de los puntos seleccionados por el usuario y definidos por el usuario de cada molécula en una preparación. Dichos uniformidad y control de la síntesis distingue notablemente la presente invención de las modificaciones al azar permitidas para la utilización de los procedimientos de la técnica anterior. De manera significativa, esto permite a uno diseñar una proteína sintética en la que cualquier resto no crítico puede modificarse para que contenga un aducto del polímero. Además, para cada uno de dichos puntos seleccionados por el usuario y definidos por el usuario, el usuario puede definir el enlace preciso (amida, tioéster, tioéter, oxima, etc.) por lo que dichos aductos estarán unidos al eje central del polipéptido o de la proteína. Además, los aductos del polímero específicos que se desea que estén presentes en un punto específico pueden variarse y controlarse, de modo que se obtiene una preparación final en la que cada proteína o polipéptido presentes contiene exactamente los mismos aductos modificados precisamente en los mismos sitios modificados. Por lo tanto, la presente invención permite la formulación de preparaciones homogéneas de polipéptido y proteínas modificadas por el polímero.

Además, de proporcionar un medio para variar la posición y el número de los puntos de acoplamiento a los que puede unirse el polímero, la presente invención permite a uno variar la naturaleza del polímero unido. Los aductos del polímero que pueden incorporarse en cualquier punto seleccionado por el usuario particular y definidos por el usuario pueden ser de cualquier longitud definida. Asimismo, de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, es posible utilizar polímeros de diferentes longitudes en diferentes puntos. Por lo tanto, las proteínas bioactivas sintéticas pueden ser monomodificadas o polimodificadas, con un aducto de polímero. Cuando más de un aducto de polímero introducido en un polipéptido o proteína específico, la utilización de polímeros puede ser "monoespeciado", "poliespeciado", "uniformemente especiado" o "especiado en forma diversa en". Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "monoespeciado" se refiere a un polipéptido o proteína que ha sido modificado por una sola especie de polímero, en cambio, el término "poliespeciado" se refiere a un polipéptido o proteína que ha sido modificado en más de una sola especie de polímero. Dichos polipéptidos o proteínas poliespeciados se dice que son "uniformemente especiados". Si en cada punto modificado del polipéptido o proteína, la misma, única especie de polímero está presente. En cambio, un polipéptido o proteína poliespeciado se dice que está "especiado de forma diversa" si los puntos modificados del polipéptido o proteína están modificados con diferentes especies de polímero.

Además, es posible variar la extensión de la linealidad o falta de ramificación del aducto del polímero en cada uno de los usuarios seleccionados en los puntos definidos por el usuario. Por lo tanto los aductos del polímero pueden ser lineales, ramificados o uniformemente ramificados. La expresión "uniformemente ramificado" hace referencia a que todas las ramificaciones de un polímero en un punto específico tienen la misma estructura y longitud. Como puede apreciarse, es posible variar independientemente tanto la longitud de cualquier ramificación individual, así como la estructura del polímero presente en dicho punto de ramificación.

En resumen, es posible definir (1) la posición y (2) la frecuencia del polímero modificado, del usuario seleccionado y de los puntos definidos por el usuario en una estructura de polipéptido o proteína, así como controlar (3) la longitud, (4) la especie y (5) el grado de ramificación presente en cada uno de dichos puntos. Además, con respecto al polipéptido y a las proteínas con múltiples modificaciones del polímero, es posible definir independientemente cada

una de las cinco variables identificadas anteriormente para cada punto. Además, con respecto a los polipéptidos y a las proteínas que tienen modificaciones del polímero ramificado, es posible definir independientemente cada una de las cinco variables identificadas anteriormente para cada punto de ramificación. Por lo tanto, existe una flexibilidad considerable de la modificación del polímero.

C. Administración de proteínas y péptidos

Los polipéptidos y proteínas bioactivos sintéticos opcionalmente modificados por el polímero pueden utilizarse como agentes farmacéuticos para efectuar el tratamiento de enfermedades y afecciones. De manera más preferida, cuando se administra a un paciente o individuo necesitado de terapia, dichos polipéptidos y/o proteínas bioactivos sintéticos se administrarán utilizando un sistema de administración de fármacos. Las utilidades de dicho sistema permiten que un fármaco esté presente en el paciente en una manera que lo hace aceptable para aumentar la eficacia de la bioactividad deseada. Los sistemas preferidos de administración de fármacos incluyen sistemas capaces de administrar polipéptidos o proteínas por las vías oral, nasal, o inhalación, o por vía intramuscular, subcutánea, transdérmica, intravenosa, intraural o intraocular.

Dichos sistemas de administración de fármacos pueden incluir formulaciones que proporcionan la liberación específica en el sitio, o que aumentan la protección para la mucosa intestinal. Las formulaciones adecuadas incluyen: formulaciones en polvo seco, administración mediante encapsulación en partículas víricas, encapsulación en liposomas, parches transdérmicos, transporte ayudado eléctricamente (terapia de electroporación) y conjugación de polímero/niazona.

Preferentemente, dichos dispositivos de administración de fármacos responderán a cambios en el medio biológico y administrarán (o dejarán de administrar) fármacos basados en estos cambios. Una gama de materiales se ha ampliado para controlar la liberación de fármacos y otros agentes activos: poli(uretanos), poli(siloxanos), poli(metilacrilato de metilo), poli(alcohol vinílico) para la hidrofilia y resistencia, poli(etileno), poli(vinil pirrolidona), poli(etil metacrilato de 2-hidroxi), poli(n-vinilpirrolidona), poli(metacrilato de metilo), poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(etilenglicol), poli(ácido metacrílico), etc. Preferentemente, se utilizarán polímeros biodegradables para facilitar la administración de fármacos. Dichos polímeros incluyen polilactidas (PLA), poliglicolidas (PGA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), polianhídridos y poliortoésteres. Los dispositivos de administración de fármacos, y los métodos para su utilización se describen en las patentes US nº 6.072.041, nº 6.041.253, nº 6.018.678, nº 6.017.318, nº 6.002.961, nº 5.879.712, nº 5.849.331, nº 5.792.451, nº 5.783.212, nº 5.766.633, nº 5.759.566, nº 5.690.954, nº 5.681.811, nº 5.654.000, nº 5.641.511, nº 5.438.040, nº 4.810.499 y nº 4.659.558.

III. Producción de proteínas sintéticas bioactivas

La producción de proteínas sintéticas bioactivas puede suponerse que tiene las etapas o componentes siguientes: diseño, síntesis, ligación peptídica, plegamiento de proteínas, evaluación de la bioactividad, modificación en el polímero del eje central del polipéptido (figura 2).

A. Diseño de las proteínas sintéticas bioactivas preferidas

Preferentemente, la proteína bioactiva sintética será una proteína estimulante de la eritropoyesis. Como se utiliza en la presente memoria, una proteína estimulante de la eritropoyesis es una proteína que interviene en la producción de glóbulos rojos. La bioactividad estimulante de eritropoyesis de una proteína puede determinarse por cualquiera de varios medios, tales como siguiendo la eritropoyesis después de la administración *in vivo*, ensayando la capacidad de la proteína para intervenir en la proliferación de las estirpes celulares dependientes de EPO, etc.

Una proteína preferida estimulante de la eritropoyesis es EPO de mamífero, más preferentemente humana, y sus análogos. La eritropoyetina es sintetizada y segregada principalmente por las células endoteliales capilares tubulares y juxtatumulares e intersticiales del riñón. La nefropatía crónica causa la destrucción de células productoras de EPO en el riñón. La consiguiente carencia de EPO provoca frecuentemente anemias. La utilización clínica principal de EPO es por consiguiente el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal grave (hematocrito inferior a 0,3) quienes suelen recibir también transfusiones así como el tratamiento de los pacientes anémicos después de la quimioterapia. Por lo general, la EPO se sintetiza de manera recombinante en células de ovario de hámster para su utilización clínica. La EPO es una proteína ácida (pI = 4,5) estable al pH y al calor relativo de 165 restos de aminoácidos en su forma madura. La EPO transporta su actividad mediante el receptor de EPO. Aproximadamente el 40 por ciento de la masa molecular de EPO se debe a su glucosilación. La glucosilación es un factor importante que determina el comportamiento farmacocinético de la EPO *in vivo*. La EPO no glucosilada tiene una vida media biológica sumamente corta. Aun así se une a su receptor e incluso puede tener una actividad específica mayor *in vitro*. Sin embargo, experimentos recientes han demostrado que la PEGilación de EPO aumenta significativamente su vida, pero disminuye significativamente la actividad de EPO en un sistema de ensayo a base de células.

Las proteínas sintéticas estimulantes de eritropoyesis ("SEP") son preferentemente análogos sintéticos modificados químicamente de la EPO urinaria humana. Preferentemente contienen uno o más restos de polímero (aún más

preferentemente restos de pPEG) unidos a uno o más resto(s) de péptidos mediante un enlace tioéter, oxima, amida u otro. Preferentemente, dichos enlaces estarán en una o más de las posiciones que están glucosiladas de forma natural en la EPO urinaria humana (es decir, las posiciones, 24, 38, 83 y 126). Aún más preferentemente, las moléculas SEP tendrán restos de pPEG en dos o más de dichas posiciones. Alternativamente, otros restos de proteína pueden ser modificados por restos de polímeros. Las posiciones de la modificación para proteínas sintéticas bioactivas incluyen los restos situados en un bucle, región o dominio desordenado de la proteína, o en o cerca de los puntos de la escisión potencial de la proteasa. Por ejemplo, las modificaciones poliméricas pueden introducirse en una o más posiciones de 9, 69 y/o 125 de EPO. El peso molecular total de las moléculas SEP puede variar entre aproximadamente 25 y aproximadamente 150 kDa, y más preferentemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 80 kDa. El peso molecular puede controlarse aumentando o disminuyendo el número y la estructura del polímero (tal como pPEG) utilizado para la modificación de un análogo dado. El P.M. hidrodinámico mediado por pPEG para los montajes más grandes es superior a aproximadamente 100 kDa. Los ensayos *in vitro* en células que expresan el receptor EPO humano indican que las SEP dadas a conocer en la presente memoria tienen una ED50 que es equivalente a la de la EPO humana glucosilada producida de manera recombinante.

Los análogos de pPEG unidos a la oxima se construyen preferentemente uniendo un pPEG funcionalizado con amino-oxi, cetona o aldehído a la proteína SEP en un aminoácido codificado de manera no natural que lleva una funcionalidad amino-oxi, cetona o aldehído en la cadena lateral. Por ejemplo, las posiciones 89 y 117 de SEP-0 y 1 contienen seudoglutamatos (un aminoácido codificado de manera no natural que lleva una cadena lateral de fórmula $-\text{CH}\alpha-\text{CH}_2-\text{S}-\text{COOH}$ (comparada con la cadena lateral de glutamato $-\text{CH}\alpha-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)). Los análogos de SEP que utilizan enlaces tioéter se construyen preferentemente para que contengan una funcionalidad tiol proporcionada por una cisteína o aminoácido no natural con una cadena lateral que lleva el tiol. La figura 3 representa la estructura básica de un tipo de proteínas estimulantes de eritropoyesis sintéticas preferidas.

En una forma de realización alternativa, las moléculas de SEP pueden comprender análogos de EPO "permutados en círculo" en los que el terminal amino y carboxi natural de EPO se han trasladado. Aun más preferentemente, dicho traslado desplazará los terminales amino y carboxi a posiciones de limitación estructural baja, tales como los bucles desordenados, etc. El bucle desordenado alrededor de las posiciones 125 y 126 (con relación al sistema de numeración del residuo de EPO natural) es un ejemplo de dicho punto de traslado. Aún más preferentemente, dichas SEP estarán exentas de disulfuro, y se modificarán químicamente para que contengan restos de polímero en los restos preseleccionados.

Alternativamente, las moléculas de SEP pueden tener terminales amino y carboxi trasladados a un punto de glucosilación natural, o a otros puntos adecuados para la glucosilación, tales como las posiciones 126 y 125. Las moléculas de SEP pueden incluir también modificaciones de los terminales amino y carboxi para eliminar o modificar la carga (tales como por amidación de carboxi, etc.).

En un ejemplo preferido de dichas moléculas circularmente permutadas, se proporcionan nuevos terminales N y C por las posiciones 126 y 125, respectivamente. Las cisteínas naturales formadoras de disulfuro en las posiciones 7, 29, 32 y 161 están sustituidas preferentemente por el aminoácido no codificado naturalmente, ácido L- α -N-buifrico (Aba), que no pueden formar puentes disulfuro. Los restos R166, E37 y V82 se sustituyen preferentemente con alaninas para mejorar la producción. Además, una cisteína adicional está insertada preferentemente entre las posiciones 1 y 166 con respecto al esquema del número de EPO natural, que está numerada por abajo como "0". La molécula resultante contiene cuatro cisteínas (en las posiciones 126, 0, 38 y 83 (leída en la dirección del terminal N al C)), que se utilizan como (1) puntos de ligación y (2) puntos de acoplamiento de pPEG formadoras de tioéter. Opcionalmente, una cisteína puede sustituir A125 para proporcionar un punto de acoplamiento de pPEG adicional. El peso molecular total de dichas moléculas de SEP en la presente invención puede estar comprendido entre aproximadamente 25 y aproximadamente 150 kDa, y más preferentemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 80 kDa. El peso molecular puede controlarse aumentando o disminuyendo el número y estructura del polímero (tal como pPEG) utilizado para la modificación de un análogo dado. El P.M. hidrodinámico mediado por pPEG para los montajes mayores es superior a 100 kDa. Los puntos de acoplamiento de pPEG opcionales están situados en las posiciones 125, 9 y 24 (leído en la dirección del terminal N al C). Los diseños adicionales del análogo de SEP presentan terminales N y C alternativos en la zona desordenada del bucle y/o restos truncados procedentes de los nuevos terminales N y/o C. La estructura básica de las moléculas preferidas permutadas en círculo se muestra en la figura 4.

Alternativamente, las proteínas sintéticas bioactivas son un G-CSF de mamífero, más preferentemente humano. El G-CSF provoca la proliferación rápida y la liberación de granulocitos neutrófilos al torrente circulatorio, y de este modo proporciona efecto terapéutico en la lucha contra la infección. La proteína GCSF humana tiene una longitud de 174 aminoácidos (patente: EP 0 459 630 (Camble, R. *et al.*)), y variantes de su secuencia se han aislado. La proteína tiene cuatro restos de cisteína y un punto de O-glucosilación en la treonina de la posición 133.

En dichas moléculas sintéticas de GCSF, puede alterarse la secuencia de aminoácidos de la molécula, con relación a la secuencia de GCSF natural, para que contenga restos hidrófobos naturales o más preferentemente no naturales codificados en una o más de las posiciones 1, 2 ó 3. Opcionalmente, dichas moléculas pueden modificarse más para

que contengan un resto hidrófobo natural, o más preferentemente codificado de forma no natural en la posición 5 de GCSF, y/o en las posiciones 173 y/o 174.

5 Preferentemente, las moléculas GCSF sintéticas estarán modificadas por el polímero (preferentemente pPEG) en una o más de las posiciones 63, 64 y/o 133 y/o en una o más de las posiciones 1 y 174. Los plímeros de pPEG pueden ser lineales o ramificados, con carga, sin carga o mixtos; y pueden tener un intervalo de peso molecular entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 kDa, y más preferentemente entre 40 y aproximadamente 70 kDa de contribución al P.M. total del pPEG dependiendo del número y estructura del pPEG utilizados para modificación. El radio hidrodinámico presenta un efecto del P.M. mayor *in vivo* (por ejemplo, un pPEG ramificado de 10 kDa presenta un P.M. efectivo de aproximadamente 55 kDa). El P.M. hidrodinámico mediado por pPEG estimado es mayor de 100 kDa.

15 Para los análogos que utilizan enlace de oxima, el pPEG está unido preferentemente a restos codificados no de forma natural que llevan una funcionalidad amino-oxi, cetona o aldehído en la cadena lateral. Para los análogos que utilizan enlace de tioéter, el pPEG está preferentemente unido a una cisteína o un aminoácido no natural con una cadena natural que lleva un tiol. Para los análogos que utilizan enlace amida, el pPEG está unido a un aminoácido natural o no natural que lleva una amina en la cadena lateral reactiva.

20 La estructura básica de las proteínas GCSF sintéticas bioactivas se muestra en la figura 5. En la figura, "J" designa un resto codificado de forma no natural que tiene una cadena lateral hidrófoba.

25 La bioactividad de dichas proteínas GCSF sintéticas bioactivas puede analizarse por medios convencionales, tales como ensayando su capacidad para mediar la proliferación de una estirpe celular humana o de ratón que depende del factor (por ejemplo, estirpe celular NFS60), o midiendo la estimulación neutrófila, y la inmunogenicidad *in vivo*, ya sea con o sin un sistema de administración que dirige >20 días de vida media/liberación).

30 Alternativamente, las proteínas sintéticas bioactivas son una quimiocina de mamífero, aún más preferentemente humana, RANTES. RANTES bloquea la entrada de las cepas de VIH M-trópicas a través del receptor primario CCR5, y también las rutas de inflamación moduladas por disminución implicadas en el asma, el rechazo de trasplante y la cicatrización de heridas (Kalinkovich, A. *et al.*, *Immunol. Lett.* (1999), 68: 281-287). Las moléculas de RANTES sintéticas difieren preferentemente de la quimiocina RANTES que está siendo modificado químicamente, de modo que (1) la serina del terminal N encontrada en la posición 1 de RANTES 1-68 se sustituye con un grupo n-nonanoilo ("NNY") y (2) la tirosina en la posición 3 se sustituye con un aminoácido codificado de forma no natural que tiene una cadena lateral hidrófoba. Se ha descubierto que dichos componentes son sumamente potentes, poseyendo ED50 en el intervalo de pM, en comparación con el intervalo de mM para "Met-RANTES 1-68" recombinante.

40 Se han creado análogos potentes de RANTES que presentan uno o más cambios adicionales a los indicados anteriormente, tal como la sustitución de la prolina en la posición 2 con un aminoácido codificado de forma no natural que tiene una cadena lateral hidrófoba, y mediante el acoplamiento de un ácido graso al terminal C de la molécula. La especificidad del receptor se ha mejorado en combinación con la potencia por modificaciones a la zona del bucle N correspondiente a los restos 12 a 20 de RANTES. En una forma de realización más preferida, las moléculas sintéticas de RANTES incorporan un resto de polímero (tal como pPEG, o nonanoy ("NNY") o Y3X en su terminal N o C para mejorar entre otros la vida media *in vivo*. El resto de pPEG se une preferentemente mediante un enlace oxima a un aminoácido codificado de manera no natural que se introduce en la posición 66, 67, 68 o enlazador en la posición 68, con preferencia a la posición 67. El ácido graso se une preferentemente mediante un enlace oxima (preferentemente mediante un enlazador) al resto 68, tal como un enlazador de di-o triptófano-péptido con aminoácidos modificados amino-oxi. Alternativamente pueden utilizarse otras químicas de acoplamiento. El peso molecular de los montajes mayores de dichos análogos de RANTES sintéticos está comprendido entre aproximadamente 25 kDa a aproximadamente 45 kDa dependiendo de la naturaleza y estructura del enlace de pPEG, y para los montajes mayores tienen un P.M. hidrodinámico mediado por pPEG superior a 60 kDa. La estructura de los análogos de RANTES sintéticos preferidos se muestra en la figura 6.

55 B. Modificación del polímero definido y específico de las proteínas y péptidos bioactivos sintéticos

60 Se dan a conocer restos químicos y polímeros, en particular polímeros solubles en agua, y su utilización para modificar proteínas, con el fin de proporcionar fármacos proteicos con propiedades mejoradas con relación a la proteína sin modificar. Los efectos beneficiosos previstos de dicha modificación comprenden de manera no limitativa (a) potencia mejorada (b) vida más larga del fármaco de la proteína en la circulación debido a la estabilidad proteolítica aumentada y a la tasas de eliminación reducidas (c) inmunogenicidad reducida y (d) posiblemente dirección diferencial en comparación a la molécula sin modificar.

65 Como se expuso anteriormente, aunque se ha utilizado polietilenglicol para modificar las proteínas (véase, por ejemplo, la patente US nº 6.027.720, Kuga *et al.*, que se refiere a la modificación de reductores de lisina de G-CSF para permitir el acoplamiento de moléculas de polietilenglicol por grupos amina reactivos), dichas modificaciones están asociadas a heterogeneidad molecular y diversidad molecular.

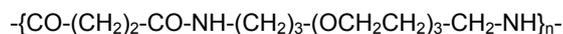
Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "heterogeneidad molecular" se refiere a una variación en el número de moléculas de polímero unidas a cada posición de una preparación de proteína. La expresión "diversidad molecular" se refiere a (a) una variación en el/los punto(s) de la proteína que están modificados por el polímero, (b) una variación en la longitud de los aductos de polímero de diferentes puntos de la misma proteína, o del mismo punto(s) en diferentes proteínas de una preparación de proteína o (c) una variación en la extensión y/o naturaleza de cualquier ramificación de los aductos del polímero de diferentes puntos de la misma proteína, o del mismo punto(s) en diferentes proteínas de una preparación de proteínas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molecularmente homogéneo" se refiere a una preparación de una proteína en la que todas las moléculas de proteína contienen la secuencia de aminoácidos y las mismas modificaciones de polímero en las mismas posiciones. Una mezcla de dos o más preparaciones proteicas "de moléculas homogéneas" se denomina en la presente memoria a una preparación "molecularmente definida".

Una solución para los problemas de heterogeneidad, diversidad e inadecuabilidad del polímero identificados anteriormente implica la producción de una nueva clase de polímeros biocompatibles que combinan las ventajas tanto de polipéptidos (longitud exacta, síntesis conveniente) y "pPEG" ("PEG de precisión"), un polímero flexible, anfifílico, no inmunógeno, polímero no sensible a las proteasas) Rose, K. *et al.* (solicitud de patente US nº de serie 09/379.297) Esta nueva clase de polímero biocompatible presenta la fórmula:

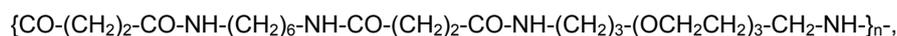


n es un número entero, preferentemente entre 1 y 100, y más preferentemente entre 2 y 100, en la que X e Y son elementos de repetición biocompatibles de estructura exacta unidos mediante un enlace amida. Preferentemente, X e Y serán radicales orgánicos divalentes que carecen de grupos funcionales reactivos o están ausentes y son iguales o diferentes, y pueden variar independientemente con cada unidad (n) de repetición. Preferentemente, cuando n = 2 por lo menos uno de entre X o Y se seleccionará de entre el grupo constituido por un grupo alifático y aromático, ramificado y lineal, sustituido, insustituido. Más preferentemente, por lo menos uno de entre X o Y los radicales orgánicos divalentes se seleccionarán del grupo constituido por fenilo, un resto alquileo C₁-C₁₀, un grupo alquilo C₁-C₁₀, un fenilo que contiene heteroátomos, un resto alquileo C₁-C₁₀ que contiene heteroátomos, un grupo alquilo C₁-C₁₀ que contiene heteroátomos y una combinación de los mismos.

Los restos de pPEG particularmente preferidos tienen la fórmula:



en la que n está comprendido preferentemente entre 1 y 100 y más preferentemente entre 2 y 100; o



en la que n preferentemente oscila entre 1 y 50 y más preferentemente entre 2 y 50.

Dichos restos de pPEG pueden sintetizarse en cualquiera de una variedad de vías. Dichos restos, sin embargo, se producen preferentemente utilizando un montaje de unidades de cadena paso a paso en fase sólida, en lugar de un proceso de polimerización. La utilización de dicho proceso de montaje permite a los restos de una preparación presentar una estructura homogénea definida, en cuanto a su longitud, la naturaleza de sus sustituyentes X e Y, la posición o posiciones (si existen) de los puntos de ramificación, y la longitud, los sustituyentes X e Y, y la posición o posiciones de algunas ramificaciones.

Preferentemente, dichos restos se sintetizarán por etapas tales como:

- (a) acilar el grupo amino o hidroxilo de un compuesto de fórmula Z-Q-soporte con un exceso molar de un derivado de un diácido que tiene la fórmula, HOOC-X-COOH, en la que Z es H₂N- o HO-; Q es un enlazador o una molécula diana; y el soporte es una fase sólida, matriz o superficie;
- (b) activar el grupo carboxilo libre del producto de la etapa (a);
- (c) aminolísado del producto de la etapa (b) con un exceso molar de una diamina que tiene la fórmula, NH₂-Y-NH₂; y
- (d) repetir opcionalmente las etapas (a)-(c) utilizando HOOC-H-COOH y NH₂-Y-NH₂, en la que dichos radicales X e Y son radicales orgánicos divalentes o faltan y son iguales o diferentes, y pueden variar independientemente con cada una de las unidades repetidas opcionalmente, y son iguales o diferentes de los sustituyentes X e Y utilizados en cualquiera de las etapas de acilación y aminolísado anteriores.

Preferentemente, se utilizan polímeros de 6, 12, 18 y 32 monómeros de la unidad de repetición anterior. Cuando se desee, puede utilizarse la unidad de repetición, por ejemplo junto con el grupo amino de lisina para formar

estructuras de pPEG ramificadas. El pPEG puede estar unido a las proteínas sintéticas mediante una variedad de químicas, incluyendo la formación de enlace tioéter, oxima y amida.

El montaje de la cadena paso a paso en fase sólida de unidades puede comprender:

5 Etapa 1: Acoplar el diácido protegido o desprotegido a amino sobre resina para generar el enlace amida en el punto de acoplamiento (en la que GP es un grupo protector que está presente o ausente dependiendo del diácido utilizado):

10
$$\text{PG-OOC-X-COOH} + \text{NH}_2\text{-Y-NH-Resina}$$

Etapa 2: Separar el grupo protector (GP) de la resina, si está presente

15
$$\text{HOOC-X-CO-NH-Y-NH-Resin}$$

Etapa 3: Acoplar el diamino protegido o desprotegido a carboxi sobre la resina para generar el enlace amida en el punto de enlace (en la que GP está presente o ausente dependiendo del diamino utilizado)

20
$$\text{PG-NH-Y-NH} + \text{HOOC-X-CO-NH-Y-NH-Resina}$$

Etapa 4: Separar el grupo protector (GP) sobre la resina, si está presente

$$\text{-NH-Y-NH-OC-X-CO-NH-Y-NH-Resina}$$

25 Etapa 5: Repetir las etapas 1 a 4 "n" veces para añadir "n" unidades a continuación se escinde de la resina

$$\text{-[CO-X-CO-NH-Y-NH]-[CO-X-CO-NH-Y-NH]-[CO-X-CO-NH-Y-NH]-[CO-X-CO-NH-Y-NH]-}$$

30 Como se expuso, resultan preferidos montajes de pPEG lineales o ramificados, polímeros solubles en agua para el acoplamiento a las moléculas sintéticas bioactivas de la invención. Los pPEG utilizados llevan grupos pendientes que están cargados o son neutros en condiciones fisiológicas, y pueden prepararse para variar en la química de acoplamiento, la longitud, la ramificación y la solubilidad dependiendo de la estructura del pPEG que se emplee. Como se indicó anteriormente, los pPEG preferidos de la invención comprenden una poliamida soluble en agua que tiene la unidad de repetición -CO-X-CO-NH-Y-NH-, en la que uno de X e Y o ambos, comprende una unidad de repetición soluble en agua, y aún más preferentemente una unidad de repetición a base de "PEG". Aunque las oligoureas son en principio accesibles utilizando un procedimiento en fase sólida en dos etapas sencillas, como se muestra a continuación para el caso de una resina amino, NH₂-resina y una diamina simétrica, NH₂-Y-NH₂:

Activación con carbonildiimidazol → im-CO-NH-resina

40 Aminólisis con diamina NH₂-Y-NH₂ → NH₂-Y-NH-CO-NH-resina

en la que estas dos etapas puede repetirse numerosas veces para dar una oligourea con la unidad de repetición -NH-Y-NH-CO-, este método es menos preferido. Esto es porque los rendimientos de las etapas anteriores pueden no ser cuantitativos a temperatura ambiente, aun con muy grande exceso de reactivos y de tiempos de reacción largos. Por consiguiente, resulta preferido utilizar un procedimiento en fase sólida de tres etapas, mostrado a continuación para el caso de una resina amino, NH₂-resina, para formar una poliamida. Los reactivos HO₂C-X-CO₂H y NH₂-Y-NH₂ deberían ser simétricos para evitar los productos isoméricos.

Acilación con el diácido HO₂C-X-CO₂H → HO-CO-X-CO-NH-Resina

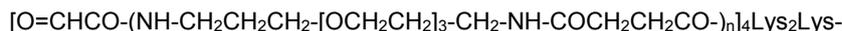
50 Activación con carbonildiimidazol → im-CO-OCO-X-CO-NH-Resina

Aminólisis con diamina NH₂-Y-NH₂ → NH₂-Y-NH-CO-X-CO-NH-Resina

Estas tres etapas pueden repetirse en la secuencia numerosas veces para dar una poliamida con unidad de repetición -NH-Y-NH-CO-X-CO-. El polímero contiene un número exacto de unidades de monómero, X e Y pueden variarse independientemente en cada etapa y los grupos terminales pueden seccionarse a voluntad. Por ejemplo, utilizando anhídrido succínico ("Succ") para la etapa de acilación y 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamida (denominada "EDA" o "TTD") para la etapa de aminólisis, se forman poliamidas a base de "PEG" en las que X es -CH₂CH₂-, Y es -NH-CH₂CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)₃-CH₂-NH- y la unidad de repetición es -NH-CH₂CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)₃-CH₂-NH-COCH₂CH₂CO-. A pesar del hecho de que el procedimiento conlleva reactivos divalentes sin grupos protectores, la reticulación no es un problema cuando se utilizan resinas para síntesis de péptidos comerciales convencionales (Rose *et al.* (solicitud de patente US nº de serie 09/379.297); y Rose *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034), excepto como se indica a continuación para el caso de los núcleos de Lys ramificados para preparar montajes ramificados.

65 Por ejemplo, pueden prepararse montajes de pPEG ramificados de manera similar como para los montajes de "quimocuerpo" descritos en Rose *et al.* (solicitud de patente US nº de serie 09/379.297) y Rose, K. y Vizzavona, J.

(*J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034), Por lo tanto, pueden prepararse montajes de pPEG ramificados que tengan un núcleo de ramificación tal como un núcleo de ramificación de lisina que se acopla mediante enlazadores de oxima a una poliamida soluble en agua preferida tal como $-(\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2\text{-NH})_n-$. Por ejemplo, pueden formarse fácilmente enlaces de oxima entre un grupo de amino-oxiacetil en una cadena lateral de Lys en la otra extremidad de la poliamida, y grupos glioxililo en un núcleo de lisina, por ejemplo el núcleo tetramérico $(\text{O=CHCO})_4\text{Lys}_2\text{Lys-}$. Por lo tanto, un grupo oxima enlazador fuera de cada punto de ramificación de lisina puede prepararse como estructura $-\text{Lys}(\text{COCH}_2\text{ON=CHCO-})\text{amida-}$. Un montaje alternativo puede colocar el enlace de oxima entre la poliamida y el grupo pendiente libre de la poliamida, utilizando preferentemente una diamina monoprotectada y desprotección después de acoplar la poliamida, para generar un montaje ramificado tetravalente representado a continuación:



La química de la oxima puede utilizarse en la preparación no sólo de montajes ramificados diméricos y tetraméricos, sino también es adecuada para ensamblar montajes octaméricos ramificados (Rose, K. *et al. J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116:30; Rose, K. *et al. Bioconj. Chem.* (1996) 7:552). Es posible, desde luego, utilizar otras químicas con tales propósitos cuando se utilizan dichas poliamidas de pPEG (véase, por ejemplo, la figura 7). Además, la formación de poliamida puede incorporarse en un esquema de síntesis para la síntesis de péptidos que conlleva la química de Boc o Fmoc, pero cuando se elaboran dichos esquemas debe tenerse presente que la etapa de aminólisis eliminará el grupo Fmoc y eliminará la protección con formilo de indol si se utiliza la química de Boc.

Por consiguiente, dichos pPEG pueden prepararse para que tengan varios núcleos de ramificación (por ejemplo, núcleo de ramificación de lisina) unidos mediante un enlace de elección (por ejemplo, amida, tioéter, oxima, etc.) a una poliamida lineal soluble en agua (por ejemplo, $-(\text{Succ-TTD})_n-$, etc.), donde el extremo libre de cada poliamida soluble en agua puede protegerse con un grupo pendiente deseado (por ejemplo, carboxilato, amino, amida, etc.) para proporcionar una carga deseada. Además, las pPEG lineales y ramificadas pueden prepararse para que comprendan un grupo funcional único para el acoplamiento a una proteína sintética que lleva uno o más grupos funcionales únicos e interactivos, y los grupos pendientes de los pPEG preferentemente serán no antigénicos (véase, por ejemplo, la figura 7).

La exposición de los antecedentes de la invención en la presente memoria se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe considerarse como una admisión de que se publicó cualquier material citado, conocido o parte de la técnica anterior o el conocimiento general común en cualquier parte del mundo como la fecha prioritaria de cualquiera de las reivindicaciones. Una vez descrita la invención de forma general, la misma se pondrá más claramente de manifiesto haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

Ejemplo 1

Síntesis de la proteína SEP-0 sintética estimulante de eritropoyesis

Se sintetizó una proteína sintética estimulante de la eritropoyesis (SEP). La secuencia de la proteína completa sintetizada (denominada "SEP-0 (1-166)" es:

APRLICDSR	VLERYLLEAK	EAEKITTGCA	EHCSLNEKIT
VPDTKVNFYA	WKRMEVGQQA	VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL
LVKSSQPWΨP	LQLHVDKAVS	GLRSLTTLR	ALGAQKΨAIS
PPDAASAAPL	RTITADTFRK	LFRVYSNFLR	GKLKLYTGEA
CRTGDR (SEC ID n°:1)			

en las que ψ indica un resto de aminoácidos no natural que consta de una cisteína que está carboximetilada en el grupo sulfhidrilo. La proteína SEP-0 se sintetizó en solución a partir de cuatro segmentos de polipéptido:

50 Segmento SEP-0:1 (GRFN 1711; compuesto de los restos 1-32 de la SEC. ID. n° 1): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-tioéster

55 Segmento SEP-0:2 (GRFN 1712; compuesto de los restos 33-88 de la SEC. ID. n° 1): CSLNEKITVP DTKVNFYAWK RMEVGQQA VEVWQGLALLSE AVLRGQALLV KSSQPW- tioéster (en la que Cys³³ está protegido por Acm)

Segmento SEP-0:3 (GRFN 1713, compuesto de los restos 89-116 de SEC ID n°:1): CPLQLHVDKA VSGLRSLTTL LRALGAQK- tioéster (en la que Cys⁸⁹ está protegido por Acm)

60 Segmento SEP-0:4 (GRFN 1714; compuesto de los restos 177-166 de la SEC. ID. n° 1): CAISPPDAAS AAPLRTITAD TFRKLFVYS NFLRGKLY TGEACRTGDR-carboxilato (en el que la cisteína del terminal C (Cys¹⁶¹) lleva un grupo protector picolil (pico))

Los péptidos SEP-0:1, SEP-0:2 y SEP-0:3 se sintetizaron sobre una resina generadora de tioéster mediante el protocolo de neutralización *in situ* para la química de Boc (terc-butoxicarbonilo) y la síntesis de péptidos en fase sólida paso a paso (SPPS) utilizando SPPS probado, protección de la cadena lateral y estrategias de la resina de tioéster (Hackeng, *et al.*, *PNAS* (1999) 96: 10068-10073 y Schnölzer, *et al.*, *J. Pept. Prot. Res.*, (1992), 40: 180-193), en un sintetizador de péptidos automático ABI433A o por ensamblado de la cadena en manual, o expedido y adquirido en vendedores comerciales. Por ejemplo, se utilizó una serie convencional de grupos protectores SPPS de Boc, a saber: Arg(Tos); Asp(cHex); Cys(4MeBzl) & Cys(Acm); Glu(cHex); His(DNP); Lys(ClZ); Ser(Bzl); Thr(Bzl); Trp(formil); Tyr(BrZ); Met, Asn, Gln se desprotegeron en la cadena lateral. El segmento SEP-0:4 se sintetizó análogamente en una -OCH₂-Pam-resina. Se desprotegeron los péptidos y simultáneamente se escindieron del soporte de resina utilizando HF/*p*-crisol según el procedimiento de química Boc convencional; sin embargo, para estos péptidos que contienen grupos protectores no eliminados en HF/*p*-crisol, se conservaron los grupos protectores. Se purificaron los péptidos por cromatografía líquida de alta presión en fase inversa de C4 de preparación (HPLC). Las fracciones que contenían péptidos puros se identificaron utilizando ES-MS (espectrometría de masas de ionización por electroatomización), se mezclaron y se liofilizaron para la ligación posterior.

Etapas 1: Ligación nº 1 Se disolvieron en TFE el segmento SEP-0:4 y el segmento SEP-0:3 a una concentración de 15 mM. Se añadió tampón fosfato saturado (pH 7,9) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y tiofenol al 1%, resultando una solución transparente de los segmentos peptídicos. La mezcla de ligación se añadió a una solución de 2 ml de TFE (trifluoroetanol), 6 ml de cloruro de guanidinio 6 M, fosfato 100 mM que contenía β-mercaptoetanol al 25% y se incubó durante 20 minutos. Se acidificó la solución con una solución de 15 mg/ml de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina-HCl) en ácido acético glacial y se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de C4 de preparación (1 pulgada de diámetro). Los péptidos se purificaron a continuación por HPLC en fase inversa con gradiente de preparación. Las fracciones que contenían el producto ligado deseado SEP-0:Acm+SEP-0:3+SEP-0:4 se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

Etapas 2: Eliminación de Acm nº 1 Para la eliminación de Acm, la solución acuosa de acetonitrilo que contenía las fracciones mezcladas de SEP-0:Acm+SEP-0:3+SEP-0:4 se diluyó una vez con agua de calidad HPLC, y urea sólida se añadió para una concentración final de 2 molar. Se añadió un exceso molar de tres veces (con relación a la concentración de cisteína total esperada) de una solución de 30 mg/ml de Hg(acetato)₂ en ácido acético acuoso al 3% y la solución se agitó durante una hora. La solución a continuación se preparó al 20% en β-mercaptoetanol, se cargó en una columna de HPLC de fase inversa de semipreparación y se purificó con un gradiente en etapas. Las fracciones que contenían el producto deseado SEP-0:3+SEP-0:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapas 3: Ligación nº 2 Cantidades iguales de SEP-0:3+SEP-0:4 y SEP-0:2 se disolvieron conjuntamente en TFE puro a una concentración de 15 mM. Se añadió tampón fosfato 250 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y tiofenol al 1%, dando como resultado una solución transparente de los segmentos peptídicos. Después de un día de ligación, la mezcla de ligación se añadió a una solución de 10 ml de TFE, 10 ml de β-mercaptoetanol, 10 ml de piperidina y 20 ml de cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, y se incubaron durante 20 minutos para eliminar cualquier grupo protector restante. Se acidificó la solución con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto ligado deseado SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapas 4: Carboximetilación Se disolvió SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4 en TFE a una concentración de 15 mM. Se añadió un exceso del doble (v/v) de tampón fosfato 200 mM (pH 7,9) que contenía cloruro de guanidinio 6 M, dando como resultado una solución transparente del segmento peptídico. Se añadió un exceso de 25 veces de ácido bromoacético disuelto en una cantidad mínima de metanol, y la solución se dejó reaccionar durante dos horas. Se acidificó la solución con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación y se purificó con un gradiente en etapa. Las fracciones que contenían el producto SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4 + Et carboximetilado se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

Etapas 5: Eliminación del picolilo Se activó polvo de zinc en HCl 2 M durante 30 minutos. Se disolvió el péptido SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et en TFE puro a aproximadamente una concentración de 10 mg/ml. Se diluyó la solución con 4 x (v/v) respecto a TFE) cloruro de guanidinio 6 M, acetato 100 mM, pH 4, que contenía 35 mg/ml de L-metionina (recién añadida) y 35 mg/ml de dodecilsarcosina (es decir N-dodecanoilsarcosina de sodio). La solución se añadió al polvo de Zn activado. La reacción se controló a intervalos de ~1 h y se terminó después de cinco horas. Tras la terminación, se eliminó el sobrenadante y el polvo de Zn restante se lavó dos veces durante cinco minutos con cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, acetato 100 mM que contenía 35 mg/ml de L-metionina y 35 mg/ml de dodecilsarcosina que contenía TFE al 20% así como una vez con la misma solución que contenía β-mercaptoetanol al 20%. El producto combinado se acidificó con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación y se purificó con un gradiente gradual. Las fracciones que contenían el producto SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico modificado deseado se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

Etapa 6: Eliminación de Acm nº 2 La solución mezclada de SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico se diluyó 3 veces con agua de calidad HPLC, y se añadió urea sólida para una concentración final de 2 molar. Se añadió un exceso molar del triple (con relación a la concentración de cisteína esperada total) de 30 mg/ml de solución de Hg(acetato)₂ en ácido acético acuoso al 3% y la solución se agitó durante una hora. La solución se preparó a continuación al 20% en β-mercaptoetanol, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de semi-preparación y se purificó con un gradiente gradual. Las fracciones que contenían el producto deseado SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico se identificaron por ES-MS, se diluyeron 2 veces (v/v) con agua que contenía 2 x (p/p con respecto a la masa de péptido) DPC (dodecilsulfocolina) y se liofilizó durante la noche.

Etapa 7: Ligación nº 3 Cantidades iguales de SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico y SEP-0:1 se disolvieron conjuntamente en TFE puro a una concentración de 15 mM y se añadió tampón fosfato 250 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de guanidinio 6 M. A la solución de se añadió tiofenol al 1%. Después de un día de ligación, la mezcla de ligación se añadió a una solución de 10 ml de TFE, 10 ml de β-mercaptoetanol, 10 ml de piperidina y 20 ml de cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, y se incubó durante 20 minutos para eliminar algunos grupos protectores restantes. La solución se acidificó con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto SEP-0 (1-166):(SEC. ID. nº 1) ligado deseado se identificaron por espectrometría de masas con electroatomización, se diluyeron 2 veces (v/v) con agua que contenía 2 x (p/p con respecto a la masa de péptido) dodecilsarcosina y se liofilizó.

Etapa 8: Plegamiento: Se disolvió el péptido SEP-0 (1-166) ligado completo en tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y TFE al 20% y un exceso molar de diez veces (con respecto a los restos de Cys en proteínas) de cisteína. Esta solución se dializó durante la noche frente a una solución de tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 3 M a temperatura ambiente. La solución se dializó a continuación frente a una solución de tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 1 M a temperatura ambiente durante 4 horas a 4°C y por último frente a tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) durante 4 horas a 4°C para dar el producto plegado final. Se verificó el plegamiento por ES-MS de electroatomización y espectrometría DC (dicroísmo circular).

Etapa 9 Purificación: El polipéptido plegado se concentró 5 veces en viales con concentrador centricon y se cargó en una columna de intercambio catiónico Resource S equilibrada en fosfato 10 mM, pH 7,0. La proteína plegada se eluyó en un gradiente salino lineal a NaCl 500 mM en 10 minutos. Las fracciones que contenían el producto SEP-0 (1-166) plegado deseado se identificaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se congelaron y almacenaron a -80°C. Un cromatograma por HPLC en fase inversa analítico y un espectro de ES-MS del producto proteico plegado, así como un espectro de DC demostró la presencia de la proteína plegada.

Ejemplo 2

Síntesis de la proteína sintética SEP-1-L30 estimulante de eritropoyesis

Se sintetizó una segunda proteína sintética estimulante de eritropoyesis (denominada SEP-1-L30) que contiene grupos formadores de oxima en las posiciones 24 y 126 de SEP-0. Estos grupos se utilizaron a continuación para formar SEP-1-L30, en la que los polímeros lineales carboxilato de (EDA-Succ)₁₈ (EDA = (4,7,10)-trioxatridecano-1,13diamina, denominado también TTD; Succ = -CO-CH₂CH₂CO-) se han unido al eje central de proteína. La secuencia de SEP-1 (1-166) completa es:

APPRLICDSR	VLERYLLEAK	EAER ^{K^{ox}} TTTGCA	EHCSLNEKIT
VPDTKVNIFYA	WKRMEVGGQA	VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL
LVKSSQPWψP	LQLHVDKAVS	GLRSLTLLR	ALGAQKψAIS
FPDAAK ^{K^{ox}} AAPL	RTTADTFRK	LFRVYSNFLR	GKLKLYTGEA
CRTGDR (SEC ID nº: 2)			

en la que ψ indica un resto de aminoácido artificial que consta de una cisteína que está carboximetilada en el grupo sulfhidrilo, y en la que K^{ox} indica una lisina artificial que está químicamente modificada en el grupo ε-amino con un grupo oxima enlazador acoplado al polímero soluble en agua diseñado mediante un enlace oxima.

A. Oximación de GRFN1776 y GRFN1711 con GRFNP32

La formación de la oxima se realizó para acoplar los polímeros solubles en agua que llevan un grupo amino-oxiacetilo a los péptidos que llevan un grupo carbonil cetona. Para su realización, se sintetizaron los siguientes segmentos peptídicos:

Segmento SEP-1:4 (GRFN 1776; compuesto de los restos 117 a 166 de la SEC. ID. nº 2): CAISPPDAAK AAPLRTITAD TFRKLFVYS NFLRGKLY TGEACRTGDR-carboxilato (en el que Lys¹²⁶ está modificado con un resto de ácido levulínico en el grupo ε-amino y en el que Cys¹¹⁷ está protegido con Acm)

Segmento SEP-1:1 (GRFN 1711; compuesto de los restos 1 a 32 de la SEC. ID. n° 2): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-tioéster (en el que Lys²⁴ está modificado con un resto de ácido levulínico)

5 Se sintetizó el segmento SEP-1:1 (GRFN 1711) en una resina generadora de tioéster y el segmento SEP-1:4 (GRFN 1776) en una resina -OCH₂-Pam- como en el Ejemplo 1. Las lisinas 24 y 126 de estos dos segmentos peptídicos se protegieron inicialmente con un grupo Fmoc en el grupo ε-amino. Una vez terminado el montaje de la cadena, los grupos amino que llevan Fmoc se desprotegeron siguiendo los procedimientos de desprotección de Fmoc estándar y se modificaron mediante acoplamiento de ácido levulínico a cada una de las resinas peptídicas, respectivamente.
10 Los péptidos se desprotegeron a continuación y se escindieron simultáneamente en el soporte de resina como se describió en el Ejemplo 1. Se purificaron los péptidos por HPLC en fase inversa C4 de preparación. Las fracciones que contenían péptido puro se identificaron utilizando ES-MS, se mezclaron y se liofilizaron para la ligación posterior. Se ensambló GRFNP32 [-(EDA-Succ)₁₈carboxilato] en la resina Sasrin generadora de carboxilo siguiendo los protocolos convencionales (Rose, K. *et al.* solicitud de patente US n° de serie 09/379.297; y Rose *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034). Se acopló un resto de amino-oxiacetil (AoA) al grupo amino N-terminal del polímero acoplado un exceso de cinco veces de ácido Boc-amino-oxiacético activado. La cadena de polímeros se escindió en el soporte de resina utilizando los procedimientos clásicos de la química de Fmoc. La cadena de polímeros se purificó por HPLC en fase inversa C4 de preparación. Las fracciones que contenían el polímero puro se identificaron utilizando ES-MS, se mezclaron y liofilizaron para la ligación posterior.

20 El segmento SEP-1:4 y GRFNP32 se disolvieron conjuntamente en una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. La solución se liofilizó a continuación. El polvo anhidro se disolvió y el péptido modificado con el polímero se separó en un péptido no modificado y un polímero sin reaccionar por HPLC en fase inversa C4 con gradiente de preparación. Las fracciones que contenían el producto SEP-1:4 + GP32 oximado se identificaron por ES-MS y se mezclaron y liofilizaron.

25 El segmento SEP-1:1 y GRFNP32 se disolvieron conjuntamente a una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. La solución se liofilizó a continuación. El polvo seco se disolvió y el péptido modificado con polímero se separó del polímero sin reaccionar por HPLC en fase inversa C4 con gradiente de preparación. Las fracciones que tenían el producto SEP-1:1 + GP32 oximado deseado se identificaron por ES-MS y se mezclaron y liofilizaron.

B. Síntesis de la proteína sintética SEP-1-L30 estimulante de eritropoyesis

35 Se sintetizó SEP-1-L30 en solución procedente de cuatro segmentos de polipéptido:

40 Segmento SEP-1:1+GP32 (GRFN 1711+ GRFNP32, correspondiente a los restos 1 a 32 de la SEC. ID. n° 2): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioéster (en el que Lys²⁴ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo oxima levulínico enlazador que está acoplado a GRFNP32 mediante un enlace oxima aminooxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox})

45 Segmento SEP-1:2 (GRFN 1712, correspondiente a los restos 32 a 38 de la SEC. ID. n° 2): CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW-tioéster (donde Cys³³ está protegido por Acm)

50 Segmento SEP-1:3 (GRFN 1713, correspondiente a los restos 89 a 116 de la SEC. ID. n° 2): CP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQK-tioéster (donde Cys⁸⁹ está protegido por Acm)

55 Segmento SEP-1:4+GP32 (GRFN 1776 + GRFNP32, correspondiente a los restos 117-166 de SEC ID n°:2): CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-carboxilato (en el que Lys¹²⁶ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo oxima levulínico enlazador que está acoplado a GRFNP32 mediante un enlace oxima aminooxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox}, y en el que la cisteína del terminal C lleva un grupo protector picolilo (pico).

60 La síntesis de péptidos adicionales, las reacciones de ligación, la carboximetilación, las reacciones de eliminación del grupo protector, el plegamiento y la purificación se realizaron como se describe en el Ejemplo 1 para dar SEP-1-L30 plegada, completa. Un cromatograma analítico de HPLC en fase inversa y un espectro de ES-MS del producto de la proteína plegada así como un espectro de DC demostró la presencia de la proteína plegada.

Ejemplo 3

Síntesis de la proteína sintética SEP-1-L26 estimulante de eritropoyesis

65 Se sintetizó una tercera proteína sintética estimulante de eritropoyesis (denominada SEP-1-L26) que contiene grupos formadores de oxima en las posiciones 24 y 126 de SEP-0. Estos grupos se utilizaron a continuación para formar SEP-1-L26, en la que los polímeros lineales carboxilato de (EDA-Succ)₁₈ y (EDA-Succ)₆-amida se han unido

al eje central de proteína mediante los enlaces oxima en las posiciones 24 y 126, respectivamente. La secuencia de SEP-1 (1-166) completa es:

APRLICDSR	VLERYLLEAK	EAEK ²⁴ ITTGCA	EHCSLNEKIT
VPDTKVNIFYA	WKRMEVGGQA	VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL
LVKSSQPWQP	LQLHVDKAVS	GLRSLTLLR	ALGAQKQWALS
PPDAAK ¹²⁶ AAPL	RTITADTFRK	LFRVYSNFLR	GKLLKLTGEA
CRTGDR (SEC ID n°: 2)			

5

en la que ψ indica un resto de aminoácido artificial que consta de una cisteína que está carboximetilada en el grupo sulfhidrilo, y en la que K^{ox} indica una lisina artificial que está químicamente modificada en el grupo ϵ -amino con un grupo oxima enlazador acoplado a un polímero soluble en agua diseñado mediante un enlace oxima.

10 En contraste con SEP-1-L30, el montaje de SEP-1-L26 se diseñó para que lleve un polímero soluble en agua más pequeño y sin carga unido en la posición 126. El polímero unido en la posición 24 era el mismo que en la SEP-1-L30. El ensamblado del producto completo fue como se describe en el Ejemplo 2.

15 A. Oximación de GRFN1776 con GRFNP6 y oximación de GRFN1711 con GRFNP32

La formación de la oxima se realizó para unir los polímeros solubles en agua que llevan un grupo amino-oxiacetilo a péptidos que llevan un grupo carbonil cetona. Para llevar a cabo esto, se sintetizaron los segmentos peptídicos siguientes:

20 Segmento SEP-1:4 (GRFN 1776; compuesto de los restos 117 a 166 de la SEC. ID. n° 2): CAISPPDAAK AAPLRTITAD TFRKLFVYS NFLRGKLLKLY TGEACRTGDR-carboxilato (en el que Lys¹²⁶ está modificado con un resto de ácido levulínico en el grupo ϵ -amino y en el que Cys¹¹⁷ está protegido con Acm)

25 Segmento SEP-1:1 (GRFN 1711; compuesto de los restos 1 a 32 de la SEC. ID. n° 2): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-(en el que Lys²⁴ está modificado con un resto de ácido levulínico)

30 Se sintetizó el segmento SEP-1:1 (GRFN 1711) en una resina generadora de tioéster y el segmento SEP-1:4 (GRFN 1776) en una resina -OCH₂-Pam- como en el Ejemplo 1. Las lisinas 24 y 126 de estos dos segmentos peptídicos se protegieron inicialmente con un grupo Fmoc en el grupo ϵ -amino. Una vez completado el montaje de la cadena, los grupos amino portadores de Fmoc se desprotegeron siguiendo los procedimientos de desprotección de Fmoc estándar y se modificaron mediante acoplamiento de ácido levulínico a cada una de las resinas peptídicas, respectivamente, siguiendo los protocolos de acoplamiento convencionales. Los péptidos se desprotegeron a continuación y se escindieron simultáneamente en el soporte de resina como se describió en el Ejemplo 1. Se purificaron los péptidos por HPLC en fase inversa C4 de preparación. Para cada péptido, las fracciones que
35 contenían péptido puro se identificaron utilizando ES-MS, se mezclaron y se liofilizaron para la ligación posterior.

Se ensambló el polímero soluble en agua (carboxilato de EDA-Succ)₁₈ (GRFNP32) en la resina Sasrin generadora de carboxilo siguiendo los protocolos convencionales (Rose, K. *et al.* solicitud de patente US n° de serie 09/379.297; Rose *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034). Se ensambló el polímero soluble en agua (EDA-Succ)₆-amida (GRFNP6) en la resina Sieber generadora de amida siguiendo los protocolos convencionales (Rose, K. *et al.* solicitud de patente US n° de serie 09/379.297; Rose *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034). Se acopló un resto de amino-oxiacetil (AoA) al grupo amino N-terminal de cada polímero unido a la resina acoplando un exceso de cinco veces de ácido Boc-amino-oxiacético activado. Las dos cadenas de polímeros se escindieron por separado de los respectivos soportes de la resina utilizando los procedimientos clásicos de la química de Fmoc. Cada cadena de
45 polímeros se purificó por HPLC en fase inversa C4 de preparación. Para cada polímero, las fracciones que contenían el polímero puro se identificaron utilizando ES-MS, se mezclaron y liofilizaron para la ligación posterior.

El segmento SEP-1:4 y GRFNP6 se disolvieron conjuntamente en una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. La solución se liofilizó a continuación. El polvo anhidro se disolvió y el péptido modificado con el polímero se separó en un péptido no modificado y un polímero sin reaccionar por HPLC en fase inversa C4 con gradiente de preparación. Las fracciones que contenían el producto SEP-1:4 + GP6 oximado se identificaron por ES-MS y se mezclaron y liofilizaron.
50

El segmento SEP-1:1 y GRFNP32 se disolvieron conjuntamente en una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. La solución se liofilizó a continuación. El polvo anhidro se disolvió y el péptido modificado con el polímero se separó en un péptido no modificado y un polímero sin reaccionar por HPLC en fase inversa C4 con gradiente de preparación. Las fracciones que contenían el producto SEP-1:1 + GP32 oximado se identificaron por ES-MS y se mezclaron y liofilizaron.
55

60 B. Síntesis de la proteína sintética SEP-1-L26 estimulante de eritropoyesis

Se sintetizó SEP-1-L26 en solución procedente de cuatro segmentos de polipéptido:

5 Segmento SEP-1:1+GP32 (GRFN 1711+ GRFNP32, correspondiente a los restos 1 a 32 de la SEC. ID. n° 2): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioéster (en el que Lys²⁴ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo oxima levulínico enlazador que está acoplado a GRFNP32 mediante un enlace oxima aminoxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox})

10 Segmento SEP-1:2 (GRFN 1712, correspondiente a los restos 33 a 38 de la SEC. ID. n° 2): CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW-tioéster (donde Cys³³ está protegido por Acm)

15 Segmento SEP-1:3 (GRFN 1713, correspondiente a los restos 89 a 116 de la SEC. ID. n° 2): CP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQK-tioéster (donde Cys⁸⁹ está protegido por Acm)

20 Segmento SEP-1:4+GP6 (GRFN 1776+GRFNP6, correspondiente a los restos 117 a 166 de la SEC. ID. n° 2): CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-carboxilato (en el que Lys¹²⁶ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo enlazador oxima levulínico que está acoplado a GRFNP6 mediante un enlace oxima aminoxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox}, y en el que la cisteína del terminal C [a saber, Cys¹⁶¹] lleva un grupo protector picolilo (pico).

25 La síntesis de péptidos adicionales, las reacciones de ligación, la carboximetilación, las reacciones de eliminación del grupo protector, el plegamiento y la purificación se realizaron como se describe en los Ejemplos 1 y 2 para dar SEP-1-L26 plegada, completa. Un cromatograma analítico de HPLC en fase inversa C4 y un espectro de ES-MS del producto de la proteína plegada así como un espectro de DC demostró la presencia de la proteína plegada.

Ejemplo 4

Síntesis de la proteína sintética SEP-1-B50 estimulante de eritropoyesis

30 Se sintetizó una cuarta proteína sintética estimulante de eritropoyesis (denominada SEP-1-B50). La secuencia de aminoácidos de la SEP-1-B50 la misma que la de la SEP-1-L30:

APPRLICDSR	VLERYLLEAK	EAEK ^{ox} ITTGCA	EHCSLNEKIT
VPDTKVNIFYA	WKRMEVGQQA	VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL
LVKSSQPW ^ψ P	LQLHVDKAVS	GLRSLTLLR	ALGAQK ^ψ VAIS
PPDAAK ^{ox} AAPL	RTITADTFRK	LFRVYSNFLR	GKLKLYTGEA
CRTGDR (SEC ID n°: 2)			

35 en la que ψ indica un resto de aminoácido artificial que consta de una cisteína que está carboximetilada en el grupo sulfhidrilo, y en la que K^{ox} indica una lisina artificial que está químicamente modificada en el grupo ε-amino con un grupo oxima enlazador acoplado al polímero soluble en agua diseñado mediante un enlace oxima.

40 Sin embargo la proteína se modificó con un montaje de polímero ramificado que tiene cuatro restos lineales (Succ-EDA)₁₂ en lugar del polímero lineal (Succ-EDA)₁₈ de SEP-1-L30. La modificación se realizó por enlaces de oxima. El ensamblado del producto completo fue como se describió en el Ejemplo 2.

A. Síntesis de la plantilla GRFNP17 que es portadora de varios grupos tiol

45 La plantilla GRFNP17 se sintetizó manualmente en una resina (4-metil)benzidrilamina (MBHA) que genera amida a escala de 0,4 mmoles. Se acopló Fmoc-Lys(Boc)-OH utilizando los protocolos de acoplamiento convencionales (Schnölzer, M., *Int. J. Pept. Protein. Res.*, (1992), 40:180-93). Se utilizaron 2,1 mmoles de aminoácido, DIEA al 10% en 3,8 ml de HBTU 0,5 M; es decir, un exceso de 5 veces de aminoácido. Después de la eliminación del grupo protector Fmoc, se acopló Fmoc-Lys(Fmoc)-OH utilizando protocolos de acoplamiento de aminoácidos convencionales (2,1 mmoles de aminoácido, DIEA al 10% en 3,8 ml de HBTU 0,5 M; es decir un exceso de cinco veces de aminoácido). Tras una segunda etapa de eliminación de Fmoc se acopló Fmoc-Lys(Fmoc)-OH utilizando protocolos de acoplamiento de aminoácidos convencionales (4,2 mmoles de aminoácido, DIEA al 10% en 7,6 ml de HBTU 0,5 M; es decir un exceso de 5 veces de aminoácido con relación a la amina libre). Después de la etapa final de desprotección de Fmoc, se acopló durante 30 minutos un exceso de 5 veces (con relación a las aminas libres) de éster pentanofluorofenílico del ácido S-acetil tioglicólico (SAMA-oPfp) en DMF. El grupo protector Boc de la cadena lateral del resto lisilo del terminal C se eliminó por dos veces un minuto de lavados en discontinuo con TFA puro, seguido de neutralización de la resina lavando con DIEA al 10% en DMF. Se disolvieron 2 mmoles del ácido Boc-amino-oxiacético y 2 mmoles de N-hidroxisuccinimida (NHS) en 3 ml de DMF. Tras la adición de 2 mmoles de DIC (di-isopropilcarbodi-imida), el ácido se activó durante 30 a 60 minutos. Se añadió la solución a la resina neutralizada y se acopló durante 1 h. Por último, los grupos acetilo unidos a S se eliminaron con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos. Se desprotegió la plantilla y simultáneamente se escindió del soporte de resina utilizando HF/p-cresol según los procedimientos convencionales de la química de Boc en presencia de cisteína como antioxidante para el aldehído libre (Schnölzer, M., *Int. J. Pept. Protein. Res.*, (1992), 40:180-93). La poliamida recuperada en B al 50% [es decir, acetonitrilo acuoso al 50% que contiene TFA al 0,1%] (aldehído libre) se congeló y se liofilizó. Para la purificación, el producto en bruto de la plantilla se disolvió en 2 ml de B al 50%, y se añadieron 100 ml de A al 100%

[es decir TFA al 0,1% en agua] para diluir la muestra (evitar la adición de cloruro de guanidinio o de acetato, ya que la adición de aldehído está garantizada). La plantilla se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación C4 equilibrada a T = 40°C en B al 3%. Se eluyeron las sales isocráticamente y la plantilla deseada, GRFNP17 se purificó en un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto deseado se identificaron por ES-MS, se mezclaron y liofilizaron.

B. Síntesis del polímero GRFNP29 soluble en agua ramificado

Se sintetizó GRFNP29, un polímero (EDA-Succ)₁₂ ramificado de 15 kDa de peso molecular por enlace generador de tioéter de la plantilla GRFNP17 que contiene tiol purificado y un polímero lineal GRFNP31, carboxilato de Br-acetil-(EDA-Succ)₁₂, en el que GRFNP31 se sintetizó sobre una resina Sasrin generadora de carboxi siguiendo los protocolos convencionales (Rose, K. *et al.*, solicitud de patente US nº de serie 09/379.297; Rose *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121:7034).

Un exceso de 1,3 veces molar (sobre los tioles totales) del GRFNP31 purificado, Br-acetilado (EDA-Succ)₁₂, y la plantilla que contenía tiol purificado GRFNP17 se disolvieron conjuntamente en Tris-HCl 0,1 M/cloruro de guanidinio 6 M, pH 8,7 a una concentración ~10 Mm. Después de la disolución, se diluyó la solución el triple (v/v) con Tris-HCl 0,1 M, tampón de pH 8,7. Se agitó la mezcla de ligación a temperatura ambiente y se controló la reacción por HPLC en fase inversa y ES/MS. Se añadió el reactivo GRFNP31 tradicional según se necesitó hasta que el producto de reacción deseado fue el producto principal. Para el ensayo, se añadieron 3 veces (v/v a la mezcla de ligación) acetato 0,1 M/cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, y la solución se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el montaje GRFNP29 puro se identificaron utilizando ES-MS, se mezclaron y liofilizaron.

C. Oximación de GRFN1776 y GRFN1711 con GRFNP29

Se sintetizaron los segmentos SEP-1:4 y el segmento SEP-1:1 tal como se describe en el Ejemplo 2. Los segmentos SEP-1:4 y GRFNP29 se disolvieron conjuntamente en una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. Se liofilizó la solución. El polvo seco se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de preparación (1 pulgada de diámetro). El péptido modificado del polímero se separó del péptido sin modificar y el polímero sin reaccionar por HPLC en fase inversa C4 de gradiente de preparación. Las fracciones que contenían el producto SEP-1:4 + GP29 oximado deseado se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

El segmento SEP-1:1 y GRFNP29 se disolvieron conjuntamente en una relación equimolar en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1%. La solución se congeló y liofilizó. El polvo seco se disolvió en acetonitrilo acuoso al 50% que contenía TFA al 0,1% y se cargó en una columna de GPC de preparación (cromatografía de penetración en gel) (1 pulgada de diámetro). El péptido modificado con polímero se separó del péptido sin modificar y del polímero sin reaccionar por elusión isocrática. Las fracciones que contenían el producto SEP-1:1 + GP29 oximado deseado se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

D. Síntesis de la proteína sintética SEP-1-B50 estimulante de eritropoyesis

Se sintetizó SEP-1-B50 (SEC. ID. nº 2) en solución procedente de cuatro segmentos de polipéptido:

Segmento SEP-1:1+GP29 (GRFN 1711+ GRFNP29, correspondiente a los restos 1 a 32 de la SEC. ID. nº 2): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioéster (en el que Lys²⁴ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo oxima levulínico enlazador que está acoplado a GRFNP29 mediante un enlace oxima aminooxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox})

Segmento SEP-1:2 (GRFN 1712, correspondiente a los restos 33 a 88 de la SEC. ID. nº 2): CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW-tioéster (donde Cys³³ está protegido por AcM)

Segmento SEP-1:3 (GRFN 1713, correspondiente a los restos 89 a 116 de la SEC. ID. nº 2): CP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQK-tioéster (donde Cys⁸⁹ está protegido por AcM)

Segmento SEP-1:4+GP29 (GRFN 1776+GRFNP29, correspondiente a los restos 117 a 166 de la SEC. ID. nº 2): CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-carboxilato (en el que Lys¹²⁶ está modificado en el grupo ε-amino con un grupo enlazador oxima levulínico que está acoplado a GRFNP29 mediante un enlace oxima aminooxiacetil-levulínico (Lev-AoA) denominado K^{ox}, y en el que la cisteína del terminal C lleva un grupo protector picolilo (pico).

La síntesis de péptidos adicionales, las reacciones de ligación, la carboximetilación, las reacciones de eliminación del grupo protector, el plegamiento y la purificación se realizaron como se describe en los Ejemplos 1 y 2, excepto que la purificación fue en una columna Resource Q, para dar SEP-1-B50 plegada, completa. Un cromatograma

analítico de HPLC en fase inversa C4 y un espectro de ES-MS del producto de la proteína plegada SEP-1-B50 así como un espectro de DC demostró la presencia de la proteína plegada.

Ejemplo 5

Síntesis de la proteína sintética SEP-3-L42 estimulante de eritropoyesis

Se sintetizó una quinta proteína sintética estimulante de eritropoyesis (denominada SEP-3-L42). La secuencia de aminoácidos de la proteína SEP-3 completa es:

```

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAECITTGCA EHCSLNECIT
VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL
LACSSQPWEP LQLHVDKAVS GLRSLTTLRL ALGAQKEAIS
PPDAACAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLLKLYTGEA
CRTGDR (SEC ID n°: 3)

```

Los restos de cisteína en las posiciones: 24, 38, 83 y 126 se modificaron con unidades del polímero (EDA-Succ)₁₈ (GRFNP32) funcionalizado con maleimida (mediante una reacción de adición de Michael) para formar SEP-3-L42.

Con detalle, se sintetizó SEP-3 en solución procedente de cuatro segmentos de polipéptido:

Segmento SEP-3:1 (GRFN 1747, correspondiente a los restos 1 a 37 de la SEC. ID. n° 3): APPRLICDSR VLERYLLEAK EAECITTGCA EHCSLNE-tioéster (en el que Cys⁷, Cys²⁹ y Cys³³ están protegidos por Acm)

Segmento SEP-3:2 (GRFN 1774, correspondiente a los restos 38 a 82 de la SEC. ID. n° 3): CIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LA-tioéster (donde Cys³⁸ está protegido por Acm)

Segmento SEP-3:3 (GRFN 1749, correspondiente a los restos 83 a 125 de la SEC. ID. n° 3): CSSQPWEP LQLHVDKAVS GLRSLTTLRL ALGAQKEAIS PPDA-tioéster (donde Cys⁸³ está en la cadena lateral protegido por Acm)

Segmento SEP-3:4 (GRFN 1750, correspondiente a los restos 126 a 166 de la SEC. ID. n° 3): CAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLLKLYTGEA CRTGDR-carboxilato (en el que Cys¹⁶¹ es Pbo [es decir, 4-(CH₃S(O)-)bencil-] protegido).

Síntesis peptídica. Los péptidos SEP-3:1 y SEP-3:2 y SEP-3:3 se sintetizaron en una resina generadora de tioéster mediante el protocolo de neutralización *in situ* para SPPS química BOC, utilizando las estrategias de protección de cadena lateral establecidas como se ha descrito en el ejemplo 1, con cambios en la estrategia del grupo protector como se aprecia en los péptidos específicos anteriores. El segmento SEP-3:4 se sintetizó de manera análoga en una resina -OCH₂-Pam. Los péptidos se desprotegeron y se escindieron simultáneamente del soporte de resina como se describe en el ejemplo 1. Los péptidos resultantes descritos anteriormente son purificados mediante HPLC-RP preparativa. Se identificaron las fracciones que contienen el péptido puro utilizando ES-MS, se acumularon y liofilizaron para su ligación posterior.

Etapas 1: Ligación n° 1 Se disolvieron en TFE el segmento SEP-3:4 y el segmento SEP-3:3 a una concentración de 15 mM. Se añadió tampón fosfato saturado (pH 7,5) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y tiofenol al 1%, resultando una solución transparente de los segmentos peptídicos. Después de la ligación, la mezcla de ligación (definida como 1 volumen) se añadió a 2 volúmenes de una solución de {2 ml de TFE, 6 ml de cloruro de guanidinio 6 M, fosfato 100 mM que contenía β-mercaptoetanol al 25%} y se incubó durante 20 minutos. Se acidificó la solución con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético glacial y se cargó en una columna de HPLC en fase inversa de C4 de preparación con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto ligado deseado SEP-3:Acm+SEP-3:3+SEP-3:4 se identificaron por ES-MS y se mezclaron.

Etapas 2: Eliminación de Acm n° 1 Para la eliminación de Acm, la solución acuosa de acetonitrilo que contenía las fracciones mezcladas de SEP-3:Acm+SEP-3:3+SEP-3:4 se diluyó una vez con agua de calidad HPLC, y urea sólida se añadió para una concentración final de 2 molar. Se añadió un exceso molar de tres veces (con relación a la concentración de cisteína total esperada) de una solución de 30 mg/ml de Hg(acetato)₂ en ácido acético acuoso al 3% y la solución se agitó durante una hora. La solución a continuación se preparó al 20% en β-mercaptoetanol, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de semipreparación y se purificó con un gradiente en etapas. Las fracciones que contenían el producto deseado SEP-3:3+SEP-3:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapas 3: Ligación n° 2 Cantidades iguales de SEP-3:3+SEP-3:4 y SEP-3:2 se disolvieron conjuntamente en TFE puro a una concentración de 15 mM. Se añadió tampón fosfato 250 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y tiofenol al 1%, dando como resultado una solución transparente de los segmentos peptídicos. Después de un

día de ligación, la mezcla de ligación (definida como 1 volumen) se añadió a 2 volúmenes de una solución de 10 ml de TFE, 10 ml de β -mercaptoetanol, 10 ml de piperidina y 20 ml de cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, y se incubaron durante 20 minutos para eliminar cualquier grupo protector restante. Se acidificó la solución con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto ligado deseado SEP-3:Acm+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 4: Eliminación de Acm Para la eliminación de Acm, la solución acuosa de acetonitrilo que contenía las fracciones mezcladas de SEP-3:Acm+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 se diluyó 1 vez con agua de calidad HPLC, y se añadió urea sólida para una concentración final de 2 molar. Se añadió un exceso molar del triple (con relación a la concentración de cisteína esperada total) de 30 mg/ml de solución de $\text{Hg}(\text{acetato})_2$ en ácido acético acuoso al 3% y la solución se agitó durante una hora. La solución se preparó a continuación al 20% en β -mercaptoetanol, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de semi-preparación y se purificó con un gradiente gradual. Las fracciones que contenían el producto ligado deseado SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 5: Ligación nº 3 Cantidades iguales de SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 y SEP-3:1 se disolvieron conjuntamente en TFE puro a una concentración de 15 mM. Se añadió tampón fosfato 250 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y tiofenol al 1%, dando como resultado una solución transparente de los segmentos peptídicos. Después de un día de ligación, la mezcla de ligación (definida como 1 volumen) se añadió a 2 volúmenes de una solución de 10 ml de TFE, 10 ml de β -mercaptoetanol, 10 ml de piperidina y 20 ml de cloruro de guanidinio 6 M, pH 4, y se incubó durante 20 minutos para eliminar algunos grupos protectores restantes. La solución se acidificó con una solución de 15 mg/ml de TCEP en ácido acético acuoso al 20%, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 6: Acoplamiento del polímero GRFNP32 Un polímero (EDA-Succ)₁₈ lineal funcionalizado con maleimida denominado GRFNP32-maleimida se preparó funcionalizando GRFNP32 con BMPS (éster de NHS del ácido 3-maleinido propiónico Pierce, USA) siguiendo los protocolos de los fabricantes para formar un polímero (EDA-Succ)₁₈ funcionalizado con maleimida [es decir, maleimida-(EDA-Succ)₁₈]. Se disolvió SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 en la cantidad mínima de TFE requerida. Se disolvió un exceso del triple de GRFNP32-maleimida en cloruro de guanidinio 6 M, fosfato 100 mM, pH 7,5 y se añadió a la solución de TFE. La evolución de la reacción de adición de Michael fue seguida por HPLC analítica en fase inversa. Una vez terminó la reacción, la solución se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de preparación y se purificó con un gradiente lineal. Las fracciones que contenían el producto SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+pPEG modificado con polímero deseado [es decir la cadena polipeptídica de 166 restos completa ligada con cuatro copias de GRFNP32 acopladas a los tioles de la cadena lateral de Cys²⁴, Cys³⁸, Cys⁸³ y Cys¹²⁶ y de este modo denominada también SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32], se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 7: Eliminación de Pbo. Para la reducción de Pbo, el polvo liofilizado de SEP3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32 se disolvió en TFA puro que contenía etanoditiol al 5%. El grupo Pbo se escindió a continuación por adición de tioanisol al 10% y bromotrimetilsilano al 15% durante 30 minutos. Se secó la solución en un rotoevaporador y se extrajo en acetonitrilo acuoso que contenía TFA al 0,1%. La solución resultante se cargó en una columna HPLC en fase inversa de semipreparación y se purificó con un gradiente gradual. Las fracciones que contenían el producto deseado SEP3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32-Pbo desprotegido por Cys¹⁶¹ se identificaron por ES-MS y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 8: Eliminación de Acm Para la eliminación final de Acm de las cadenas laterales de Cys⁷, Cys²⁹ y Cys³³, la solución acuosa de acrilonitrilo que contenía las fracciones mezcladas de SEP3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32-Pbo se diluyó 1 vez con agua de calidad HPLC, y se añadió urea sólida para una concentración final de 2 molar. Se añadió un exceso molar del triple (con relación a la concentración de cisteína esperada total) de 30 mg/ml de solución de $\text{Hg}(\text{acetato})_2$ en ácido acético acuoso al 3% y la solución se agitó durante una hora. La solución se preparó a continuación al 20% en β -mercaptoetanol, se cargó en una columna de HPLC en fase inversa C4 de semi-preparación y se purificó con un gradiente gradual. Las fracciones que contenían el producto deseado SEP-3 (1-166) y se liofilizaron durante la noche.

Etapa 9: Plegamiento: Se disolvió el péptido SEP-3 (1-166) ligado completo en tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 6 M y TFE al 20% y un exceso molar de diez veces (con respecto a los restos con Cys en SEP-3) de cisteína. Esta solución se dializó durante la noche frente a una solución de tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 3 M a temperatura ambiente. La solución se dializó a continuación frente a una solución de tampón Tris 200 mM (pH 8,7) que contenía cloruro de guanidinio 1 M a temperatura ambiente durante 4 horas a 4°C y por último frente a tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) durante 4 horas a 4°C para dar el producto plegado final. Se verificó el plegamiento por ES-MS de electroatomización y espectrometría DC.

Etapa 10 Purificación: El polipéptido plegado se concentró 5 veces en viales con concentrador centricon y se cargó en una columna de intercambio catiónico Resource S equilibrada en fosfato 10 mM, pH 7,0. La proteína plegada se

eluyó en un gradiente salino lineal a NaCl 500 mM en 10 minutos. Las fracciones que contenían el producto SEP-3-L42 plegado deseado se identificaron por SDS-PAGE y se congelaron y almacenaron a -80°C.

Ejemplo 6

5

Ensayo de bioactividad de proteínas sintéticas estimulantes de eritropoyesis

10

15

La bioactividad de las proteínas sintéticas estimulantes de eritropoyesis, SEP-0, SEP-1-L26, SEP-1-L30, SEP-1-B50 y SEP-3-L42 se determinó utilizando las estirpes celulares UT/7 y 32D 103197, en ensayos de proliferación de la estirpe celular dependiente del factor utilizando eritropoyetina recombinante comercial como patrón de referencia. La UT-7 es una estirpe celular de leucemia megacarioblástica humana con absoluta dependencia de una de las interleucinas-3, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) o de eritropoyetina (EPO) para el crecimiento y la supervivencia (Miura, Y. *et al.*, *Acta Haematol.* (1998) 99:180-184; Komatsu, M. *et al.*, *Cancer Res.* (1991) 51:341-8). 32D 103197 es una estirpe celular hemopoyética murina (Metcalf, D., *Int. J. Cell Cloning* (1992) 10: 116-25).

20

25

Las soluciones madre de montajes de SEP se prepararon en un medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), FBS al 10% (suero bovino fetal), glutamina y Penstrep, y 2 x diluciones en serie de estas soluciones madre se añadieron a placas multipocillo a las que se les añadieron células UT/7 EPO a una concentración de 5.000 células/50 µl. Se incubaron las placas a 37°C en presencia de CO₂ al 5% y se controló diariamente el crecimiento. Después de cuatro días, se añadieron 20 µl de 2,5 mg/ml de MTT (metiltiazol tetrazolio) en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron las placas durante cuatro horas. Se añadieron 150 µl de IPA y se leyó la absorbancia de cada pocillo a 562 nm. Los valores de ED50 (dosis eficaz para alcanzar 50% de efecto máximo) para los compuestos de SEP se determinaron y compararon con los de rhEPO (eritropoyetina humana recombinante) producida por células CHO (ovario de hámster chino). Los resultados de estos experimentos demostraron que todas las proteínas sintéticas estimulantes de eritropoyesis presentaban bioactividad. Los resultados de la ED50 para SEP-0, SEP-1-L26, SEP-1-L30 y SEP-1-B50 se muestran en la Tabla VI.

30

Tabla VI

Proteína estimulante de eritropoyesis	Valores de ED50 <i>in vitro</i> (µM)	
	Células UT-7 (humanas)	Células 32D 103197 (ratón)
SEP-0	1,570	863
SEP-1-L26	46,5	100,8
SEP-1-L30	71,5	182,5
SEP-1-B50	182	6200
rh EPO	32,5	136,3

Listado de secuencias

35

40

45

50

55

- <110> Gryphon Sciences
- <120> "Ligación química "seudo"-natural
- <130> 03504.268
- <140>
- <141>
- <150> 60/231.330
- <151> 2000-09-08
- <150> 60/236.377
- <151> 2000-09-29
- <160> 3
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Lys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Lys Ser Ser Gln Pro Trp Cys Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Cys Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

- 5 <210> 2
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Lys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Lys Ser Ser Gln Pro Trp Cys Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Cys Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Lys Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

- 15 <210> 3
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

20 <400> 3

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Cys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Cys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Cys Ser Ser Gln Pro Trp Cys Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Cys Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Cys Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para sintetizar un polipéptido deseado de fórmula:



10 en la que Q y W indican cada uno la presencia opcional de uno o más restos de aminoácidos adicionales, aa_{NH_2} indica el resto de aminoácido con terminal N del polipéptido; aa_x y aa_y indican los restos de aminoácidos adyacentes internos, que presentan las cadenas laterales x e y, respectivamente, y en la que aa_y es un resto de aminoácido no especificado ribosómicamente y aa_{COOH} indica el resto de aminoácido con terminal C del polipéptido; comprendiendo el procedimiento:

15 (A) ligar un primer péptido que presenta la fórmula: $aa_{NH_2}-Q-aa_x-COSR$, en la que R es cualquier grupo compatible con el grupo tioéster, a un segundo péptido que presenta la fórmula: $Cys-W-aa_{COOH}$, para formar así el polipéptido: $aa_{NH_2}-Q-aa_x-Cys-W-aa_{COOH}$; y

20 (B) incubar dicho polipéptido en presencia de un reactivo $R_{aa}-X$, en el que $R_{aa}-X$ se selecciona de entre el grupo constituido por $X-CH_2COOH$, $X-(CH_2)_2COOH$, $X-(CH_2)-C(O)NH_2$, $X-CH_2OH$, $X-CHOHCH_3$, $X-CH_2CHOHCH_3$, $X-CH_2CH_2OH$, $X-(CH_2)_2NH-GP$, $X-CH_2NH-C(NH_2)_2$, $X-(CH_2)_2NH-C(NH_2)_2$, $X-CH_2CH_3$, $X-CH_2\phi$, $X-\phi-OH$ (para), $X-CH_2\phi-OH$ (para), $X-CH_2\phi-OPO_3$ (para), $X-CH_2-\phi-(OH)_2$ (meta para), $X-CH(COOH)_2$, $X-CH_2-IM-GP$, $X-CH-(CH_3)_2$, $X-CH_2CH-(CH_3)_2$, $X-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$, $X-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$, en la que X es I o Br, y $X-\phi$, en la que X es F, y $X-CH_2-IN$, en la que X es F, I o Br, en la que ϕ indica un grupo bencilo, *IN* indica un grupo indol, *IM* indica un grupo imidazol y *GP* indica un grupo protector;

25 siendo dicha incubación en condiciones suficientes para formar dicho polipéptido deseado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que R es un grupo arilo, bencilo o alquilo.

Figura 1

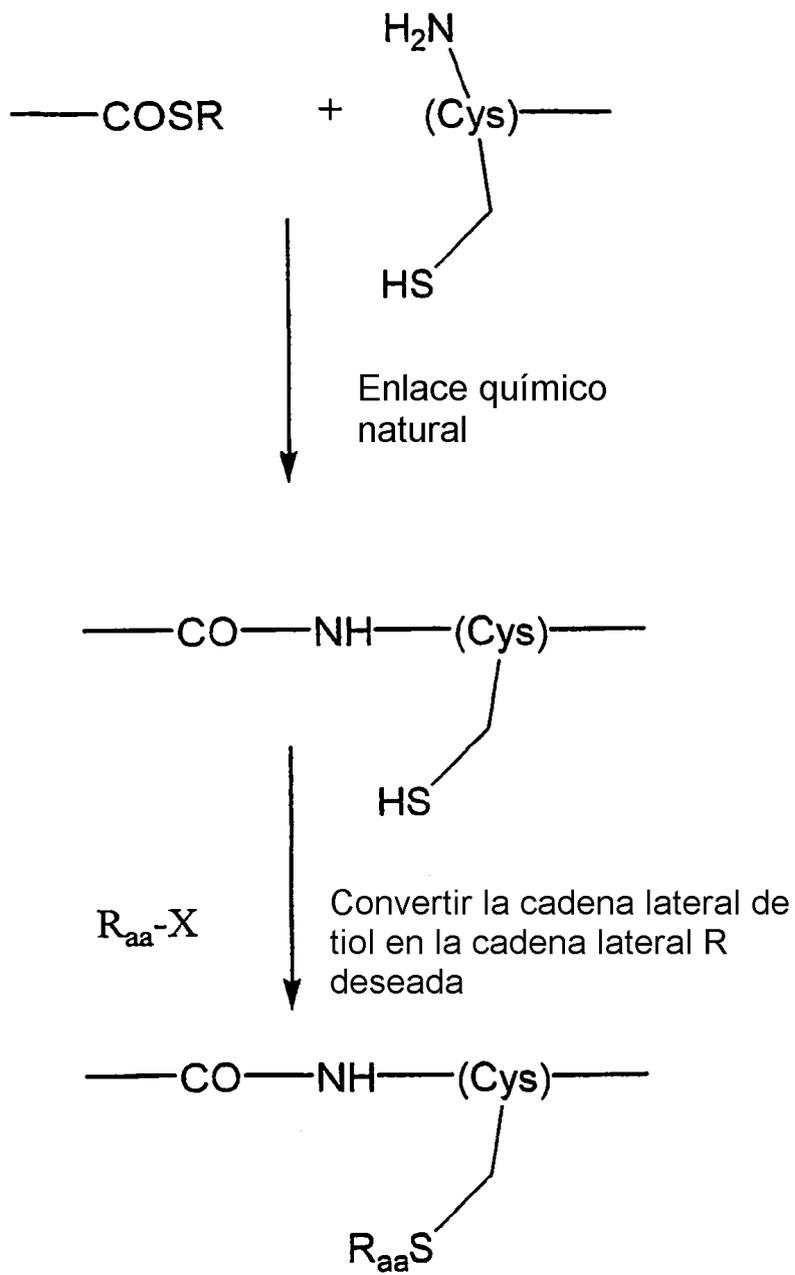


Figura 2

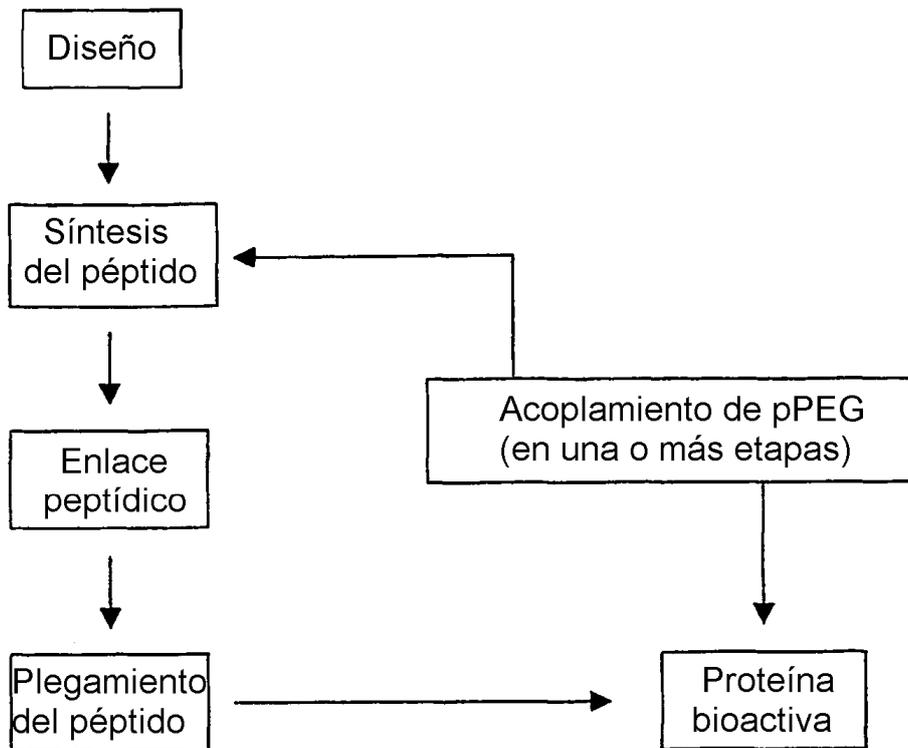


Figura 3

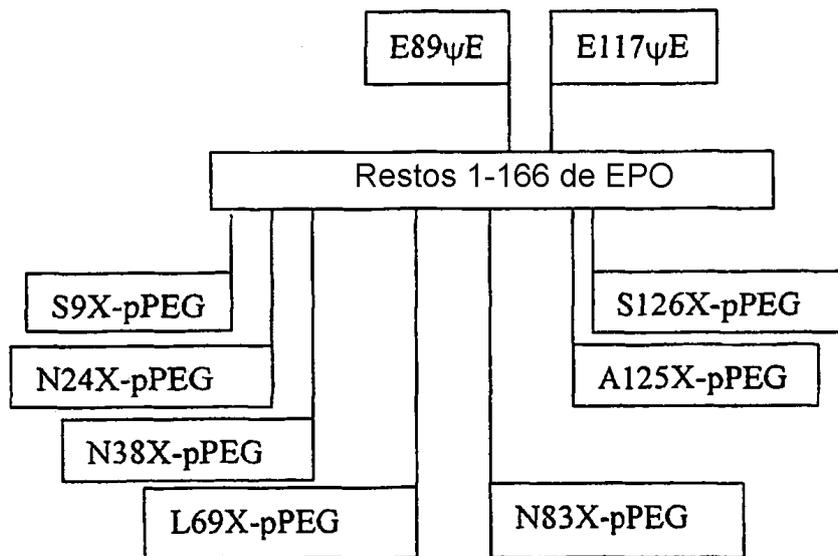


Figura 4

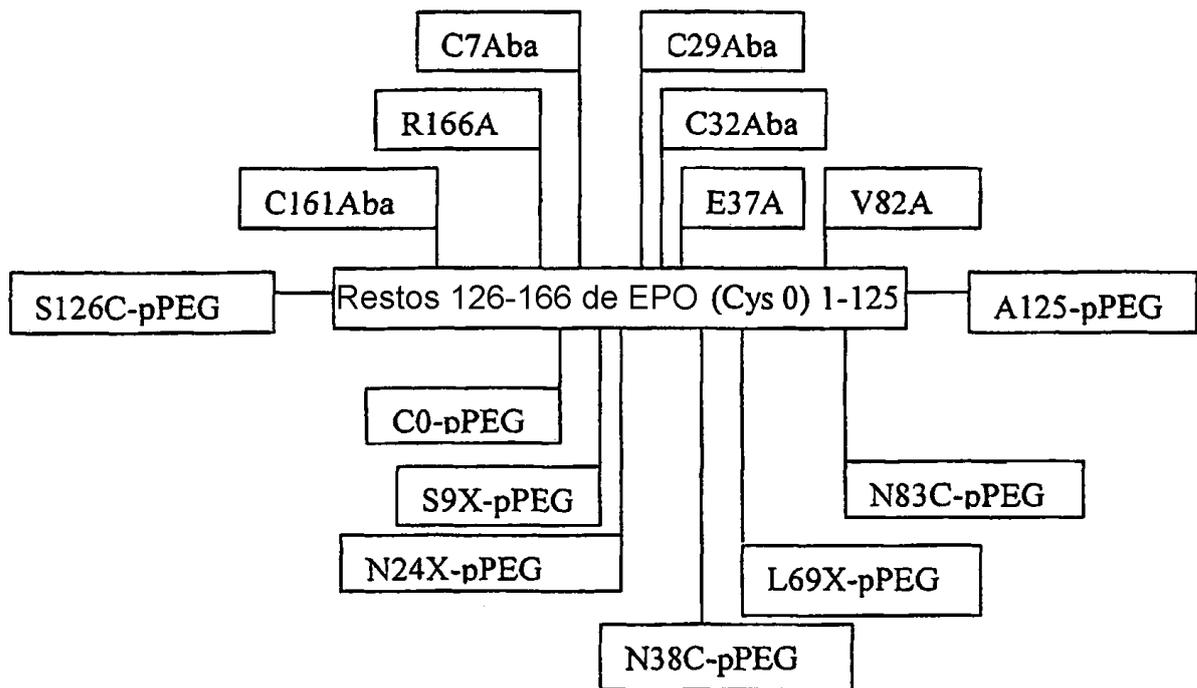


Figura 5

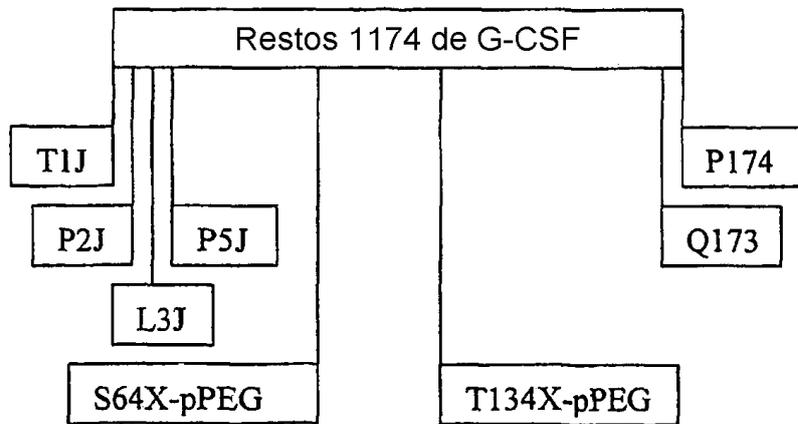


Figura 6

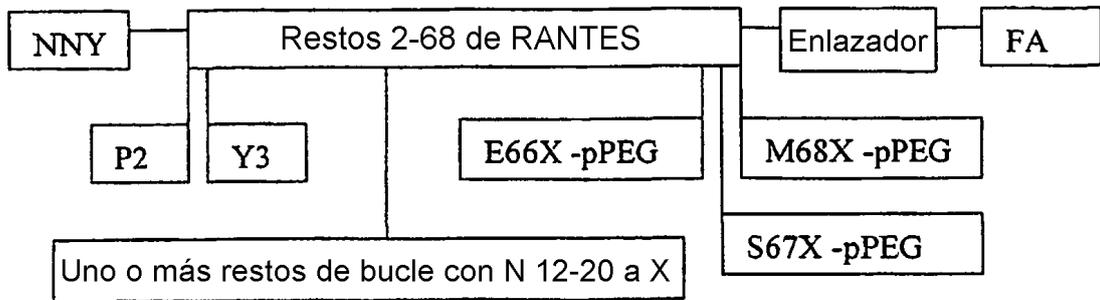


Figura 7

Preparación de montajes de pPEG ramificados

