

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 703**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/04** (2006.01)

**C07K 1/06** (2006.01)

**C07K 14/46** (2006.01)

**C07K 14/465** (2006.01)

**C07K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2003 E 03723102 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1493747**

54 Título: **Procedimiento para producir un péptido modificado**

30 Prioridad:

**11.04.2002 JP 2002109761**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.04.2013**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (50.0%)  
3-5-1, NIHONBASHI HONCHO,  
CHUO-KU, TOKYO, JP y  
KANGAWA, KENJI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MINAMITAKE, YOSHIHARU;  
MATSUMOTO, MASARU y  
MAKINO, TOMOHIRO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 400 703 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para producir un péptido modificado

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un método para producir una proteína o péptido modificado, y a un método para producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, que se usa de manera adecuada para el método de producción mencionado anteriormente.

**Técnica anterior**

10 En 1999 se purificó y se aisló de estómago de rata un secretagogo de hormona de crecimiento (GHS) endógeno para un receptor de secretagogo de hormona de crecimiento (GHS-R), que es uno de los receptores huérfanos, y se denominó ghrelina (Kojima *et al.*, Nature, vol. 402, págs. 656-660, 1999). Se sabe que este péptido tiene una estructura característica en la que un grupo hidroxilo de un residuo de serina está acilado con un ácido graso. Además, también se aisló ghrelina en la que un residuo de serina o un residuo de treonina en la posición 3 contiene un sitio modificado por ácido graso de un vertebrado distinto de rata, tal como ser humano, ratón, cerdo, ave, anguila, vaca, caballo, oveja, rana, trucha o perro, o se supuso a partir de ADNc (tabla 1). Por ejemplo, la ghrelina humana consiste en 28 aminoácidos, y la cadena lateral de serina en la posición 3 está acilada con un ácido graso (ácido N-octanoico). Se ha descubierto que este péptido novedoso tiene una fuerte actividad de secretagogo de hormona de crecimiento, y la modificación de la serina o la treonina en la posición 3 con un ácido graso es esencial para la manifestación de la actividad (Kojima *et al.*, Nature, vol. 402, págs. 656-660, 1999). Además, se ha aclarado que la ghrelina secretada del estómago funciona como una hormona de la sangre en la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento, y por tanto se ha prestado mucha atención al papel fisiológico de la ghrelina y a su aplicación a medicamentos.

Tabla 1

	Humana	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
		:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
25	De rata	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
		:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
	De ratón	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
	Porcina	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKVQQRKESKKPAAKPKPR
	Bovina	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLKPR
30	Ovina	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
	Canina	:	GSS(n-octanoil)FLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR
	De anguila	:	GSS(n-octanoil)FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH <sub>2</sub>
	De trucha	:	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQVRQGKGKPPRV-NH <sub>2</sub>
		:	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQVGKPPRV-NH <sub>2</sub>
35	De pollo	:	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKTRKPTAR
		:	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKTRKPTAR
		:	GSS(n-octanoil)FLSPTYKNIQQQKTRKPTARLH
	De rana toro	:	GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNM
		:	GLT(n-decanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNM
40		:	GLT(n-octanoil)FLSPADMQKIAERQSQNKLRHGNMN
	De tilapia	:	GSS(n-octanoil)FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH <sub>2</sub>
	De siluro	:	GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRV-NH <sub>2</sub>
		:	GSS(n-octanoil)FLSPTQKPQNRGDRKPPRVG

Equina : GSS(n-butanoil)FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR

Además de un péptido modificado con grupo octanilo (C8), hay péptidos modificados con grupo butanoilo (C4), con grupo hexanoilo (C6), con grupo decanoilo (C10) y con grupo dodecanoilo (C12). Además, hay péptidos modificados con ácido graso insaturado.

5 Algunos péptidos o proteínas, como ghrelina y colecistocinina, manifiestan su papel fisiológico cuando un residuo de aminoácido específico en la secuencia de aminoácidos ha experimentado modificación tal como acilación, sulfonación, glicosilación o fosforilación. Se cree que estas modificaciones se producen por un elaborado sistema enzimático en un organismo vivo, y todavía no se ha notificado un método general para producir una proteína o péptido modificado de una manera eficaz y con alta calidad en grandes cantidades. Por ejemplo, puesto que la ghrelina muestra actividad de secretagogo de hormona de crecimiento mediante la modificación de una cadena lateral de aminoácido específico con un ácido graso de cadena larga, la modificación con ácidos grasos es un elemento estructural esencial. Sin embargo, todavía no se sabe qué sistema enzimático de un organismo vivo está implicado para la unión de tipo éster de un ácido graso a un grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácido específico o para la extensión de un ácido graso. Puesto que en particular, la ghrelina es el primer péptido fisiológicamente activo que se ha aclarado que tiene una estructura en la que un grupo hidroxilo de una cadena lateral de aminoácido está modificado con un ácido graso, aunque el presente péptido es una hormona peptídica útil que se espera que sea un medicamento prometedor como medicina curativa para trastornos de la alimentación, un fármaco para promover la secreción de hormonas de crecimiento, etc., no se ha generalizado la producción de un péptido que tenga una modificación con ácido graso en una cadena lateral de aminoácido específico que contiene hidroxilo. Es decir, en la actualidad no se ha establecido un método de producción industrial que sea ventajoso para la producción en masa de un péptido de este tipo.

25 Actualmente, se usan como medicamento diversas preparaciones de péptido o proteína tales como insulina, hormona de crecimiento, calcitonina, péptido natriurético auricular, derivado de LH-RH y derivado de hormona adrenocorticotrópica. Como método para producir estos péptidos o proteínas, se conoce la producción mediante un método de síntesis química, un método enzimático y un método de recombinación genética. Sin embargo, en cuanto a la selección apropiada de qué método emplear, generalmente se selecciona un método de síntesis química cuando el número de residuos es pequeño, y se selecciona un método enzimático o un método de recombinación genética cuando el número de residuos es grande.

30 Un método de síntesis química, por ejemplo, es un método mediante el cual puede producirse de manera continua un péptido o proteína fisiológicamente activos que tienen una modificación tal como ghrelina, etc. Ya se han notificado muchos métodos de producción que usan un método de síntesis química como un método para producir una proteína o péptido modificado. Se han descrito métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en Shapiro *et al.* (Tetrahedron Letters, 35, 869-872 (1994)) y Fischer (Tetrahedron Letters, 33, 7605-7608 (1992)). Shapiro *et al.* (loc. cit.) describen además la síntesis en fase sólida de péptidos que comprenden un aminoácido modificado, más específicamente fosfoserina. En ambas publicaciones, se producen de manera concomitante la escisión de la resina y la desprotección de los péptidos. En el caso de la ghrelina se notifican métodos por Bednarek *et al.* (J. Med. Chem., vol. 43, págs. 4370-4376, 2000) y Matsumoto *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 284, págs. 655-659, 2001). Además, la publicación internacional n.º WO 01/07475 describe un método de producción mediante un método de síntesis química, como un método para producir un péptido que es ghrelina o un derivado de ghrelina, o una sal de los mismos. Sin embargo, en una producción mediante un método de síntesis química, habitualmente hay una limitación a la longitud de cadena del péptido que puede sintetizarse, mientras se mantiene una calidad constante (pureza). Aunque un método de síntesis química en fase líquida puede sintetizar un péptido de alta pureza, el método no es común para la síntesis de un péptido de cadena larga debido a la solubilidad, la larga etapa de producción y las técnicas especiales necesarias para el tratamiento de la reacción. Concretamente, la producción eficaz en grandes cantidades es difícil en un método de producción que usa un método de síntesis química en fase líquida. Por otra parte, la síntesis química en fase sólida para extender una cadena peptídica en una resina tiene una etapa simplificada, y es más ventajosa para la producción en masa, pero este método también tiene una limitación en la longitud de cadena que puede construirse para obtener productos deseados que tengan calidad constante. Además, también está el problema de que el método es inferior en propiedades económicas debido a los excesivos reactivos usados, en particular, en la producción de un péptido de cadena larga.

55 Mientras tanto, un método para acoplar enzimáticamente un fragmento de péptido tal como un método enzimático, es excelente porque puede minimizarse la protección de una cadena lateral de aminoácido. En este método, sin embargo, puesto que habitualmente se usa una reacción inversa de hidrólisis, el ajuste de las condiciones es en principio difícil, y por tanto el método no es práctico.

60 Por otra parte, la producción de un péptido o proteína fisiológicamente activos mediante un método de recombinación genética es un método de producción útil adecuado para la producción en masa. Sin embargo, en un método que usa un organismo procarionta tal como *Escherichia coli* que tiene alta productividad, es difícil producir directamente un péptido que tiene un sitio modificado, puesto que un organismo procarionta no tiene sistema de modificación tras la traducción. En un método de recombinación genética que usa un organismo eucariota tal como levaduras y diversos óvulos, es posible una modificación tal como glicosilación, acilación, sulfonación y fosforilación,

sin embargo, en lo que se refiere a un ácido graso, por ejemplo, es difícil introducir sólo ácidos grasos que tengan una longitud constante. Entre las ghrelinas aisladas, se han encontrado ghrelinas que tienen no sólo ácido octanoico (C8) sino también ácido butanoico (C4), ácido decanoico (C10), o un ácido graso insaturado de los mismos, y por tanto está claro es difícil controlar la introducción de un ácido graso que tenga una longitud de cadena específica. Además, puesto que la productividad por un organismo eucariota generalmente es baja, aún cabe mucha mejora en el sistema de producción de levaduras y diversos óvulos que tengan un sistema de modificación, desde el punto de vista de la producción en masa de una proteína o péptido modificado tal como ghrelina.

Tal como se describió anteriormente, aunque un método de síntesis química se ha conocido como un método para sintetizar una proteína o péptido modificado, y ya hay diversos informes, aún cabe mucha mejora en un método de este tipo en cuanto al rendimiento y el coste para el fin de la producción en masa. Es difícil producir directamente una proteína o péptido modificado mediante un método de recombinación genética usando un organismo procarionta tal como *Escherichia coli*. Además, la producción mediante un método de recombinación genética que usa un organismo eucariota tal como las levaduras tiene un problema con la unidad o productividad, y por tanto aún cabe mucha mejora con el fin de superar este problema. En un método enzimático que usa una reacción inversa de hidrólisis, es difícil fijar las condiciones de condensación respectivas y, por tanto, no puede decirse que este método sea un método ventajoso para la producción en masa.

Tal como se describió anteriormente, cabe mucha más mejora en la producción eficaz de un péptido o una proteína que tienen una modificación tal como glicosilación, acilación, sulfonación, fosforilación, etc., que satisfaga elementos de calidad y cuantitativos, mediante la aplicación independiente de un método de síntesis química, un método enzimático o un método de recombinación genética conocidos de manera convencional solos.

Entonces, como uno de los métodos que utilizan las ventajas de los métodos mencionados anteriormente y que compensan los defectos de los métodos, puede facilitarse a modo de ejemplo un método de semi-síntesis obtenido mediante la combinación de un método de síntesis química y un método de recombinación genética. Un punto importante del método de producción es producir de manera eficaz un fragmento de péptido en forma adecuada para la condensación. Un fragmento de péptido que tiene un residuo de aminoácido modificado (a continuación en el presente documento, también denominado un componente modificado) y un fragmento de péptido que no tiene un residuo de aminoácido modificado (a continuación en el presente documento, también denominado un componente no modificado) puede estar en un lado N-terminal o en un lado C-terminal, o puede haber una pluralidad de componentes modificados. Puede diseñarse de manera apropiada un método de producción dependiendo del péptido o la proteína deseados. Como ejemplo, se describirá en detalle el caso en el que un componente modificado está presente en un lado N-terminal y otro fragmento de péptido que va a condensarse con el fragmento de péptido (componente modificado) es un componente no modificado.

Un método de ligamiento químico nativo (Dawson *et al.*, Science, vol. 266, págs. 776-779, 1994) al que se ha prestado atención recientemente tiene el defecto de que un residuo de Cys permanece en un sitio de ligamiento. Recientemente, sin embargo, se ha propuesto un método con tioéster mediante la mejora del método mencionado anteriormente. Por ejemplo, Kawakami *et al.* han notificado una síntesis de péptido fosforilado mediante un método que usa tioéster (Tetrahedron Letter, vol.41, págs. 2625-2628, 2000).

A continuación se describirá un ejemplo específico del método de tioéster. En un ejemplo de síntesis de una proteína p21Max fosforilada (Kawakami *et al.*, Tetrahedron Lett., vol.39, págs. 7901-7904, 1998), se produce un fragmento de péptido (componente modificado) (13-mero) que contiene un sitio modificado con ácido fosfórico como tioéster mediante un método de síntesis química en fase sólida. Por otra parte, se produce un fragmento de péptido que tiene una secuencia en la que se añade un residuo de aminoácido al extremo N-terminal de un componente no modificado en *Escherichia coli*, se hace actuar ácido glioxílico sobre éste en presencia de un ion divalente de cobre o níquel para convertir un residuo de aminoácido añadido al extremo N-terminal en un grupo  $\alpha$ -cetoacilo y se protege un grupo amino de cadena lateral con un grupo Boc. Entonces, se elimina un grupo  $\alpha$ -cetoacilo con fenilendiamina, por lo que se produce de manera libre un fragmento de péptido (componente no modificado) con sólo un grupo de aminoácido en el residuo de aminoácido N-terminal. Finalmente, ambos fragmentos se condensan añadiendo un agente de esterificación activo tal como una sal de plata, HOOBt en exceso, etc.

Además, en el método mencionado anteriormente, todavía sigue existiendo el siguiente problema. Existe un problema con la estabilidad del tioéster en la producción de un fragmento de péptido (componente modificado), y se notifica que el rendimiento es del 11%. Además, para la producción de un fragmento de péptido (componente no modificado), dicho método que usa un grupo  $\alpha$ -cetoacilo es una posible elección como un método químico de liberar un grupo amino N-terminal. Sin embargo, el método tiene un problema de seguridad porque un grupo  $\alpha$ -cetoacilo es inestable, y se usa una sustancia mutagénica tal como fenilendiamina para eliminar el grupo, cuando se produce un péptido o proteína fisiológicamente activos para medicamento. Además, se usa un agente de esterificación activo tal como sal de plata, HOOBt en exceso, etc., en una reacción de condensación de ambos fragmentos y, por tanto, también existe el problema de la racemización, la toxicidad y el coste.

En la publicación internacional n.º WO 01/07475 se describe un método de semi-síntesis que combina un método de síntesis química y un método de recombinación genética como un método para producir un péptido que es ghrelina o un derivado de ghrelina, o una sal de los mismos. Más específicamente, se describe un método para producir

ghrelina de rata (1-28) mediante la condensación de ghrelina de rata (1-5) preparada mediante un método de síntesis química con ghrelina de rata (6-28) preparada mediante un método de recombinación genética. Sin embargo, puesto que un método de este tipo también tiene el siguiente problema, aún cabe mucha mejora con el fin de obtener un método de producción eficaz e industrialmente ventajoso. Es decir, aún cabe mucha mejora en la productividad teniendo en cuenta que, cuando la ghrelina de rata (1-5) se obtiene mediante la eliminación de una cadena peptídica con TFA de una resina, al mismo tiempo se eliminan un grupo Boc y un grupo t-Bu, y por tanto es necesario introducir de nuevo un grupo Boc en un extremo N-germinal, y que puesto que una cadena lateral de Ser queda desprotegida, no puede usarse un agente de activación fuerte para la condensación con ghrelina de rata (6-28), etc. Además, en un proceso de condensación de ghrelina de rata protegida (1-5) y ghrelina de rata protegida (6-28), puede racemizarse un aminoácido C-terminal de un fragmento de acilpéptido, y por tanto aún cabe mucha mejora con el fin de prevenir este problema. En el presente documento, ghrelina (m-n) significa un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de m.º a n.º desde un extremo N-terminal de ghrelina. A continuación en el presente documento, lo mismo.

Además, existen algunos problemas en la preparación de un fragmento de péptido protegido (componente no modificado). Un método para producir ghrelina de rata protegida (6-28) descrito en la publicación internacional n.º WO 01/07475 adopta fundamentalmente un método de tratamiento enzimático de dos etapas (Publicación internacional n.º WO 99/38984) y, como enzima de procesamiento del mismo, se usan dos tipos de enzimas, es decir un derivado de proteasa V8 recombinante (rV8D5) (documento JP-A n.º 9-47291) y una proteasa Kex2 (documento JP-A n.º 10-229884). Sin embargo, puesto que se construye un plásmido (pG97s rGR) que expresa una proteína de fusión que contiene ghrelina de rata protegida (6-28) basándose en un plásmido (documento JP-A n.º 9-296000) que expresa altamente una proteína de fusión de derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y hormona paratiroidea humana (1-34), puede seleccionarse una secuencia de ligador adecuada para su secuencia de aminoácidos en la preparación de un fragmento de péptido protegido (componente no modificado).

Además, puesto que se da el fenómeno de que se elimina un grupo protector para ghrelina de rata protegida (6-28) en una disolución acuosa, la tasa de recuperación en la etapa de purificación es de tan solo el 10%, y por tanto todavía existe el problema de un suministro estable de ghrelina en grandes cantidades.

Tal como se describió anteriormente, incluso una combinación de un método de síntesis química y un método de recombinación genética tiene un problema adicional para obtener un método para producir eficazmente una proteína o péptido modificado fisiológicamente activos, que sea suficientemente seguro para usarse como medicamento.

### Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método industrial sencillo y eficaz para producir un péptido o una proteína modificados. Específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir de manera eficaz una proteína o péptido modificado fisiológicamente activos que tengan una alta calidad mediante la producción de un fragmento de péptido que contiene un sitio modificado (componente modificado) usando un método de síntesis química, la producción de un fragmento de péptido que no contiene una parte modificada (componente no modificado) usando un método de recombinación genética, y condensándolos. Tal como se describió anteriormente, estos fragmentos de péptido respectivos (componente modificado y componente no modificado) pueden ser o bien de un fragmento en el lado N-terminal o un fragmento en el lado C-terminal, o pueden tener una pluralidad de componentes modificados. Puede diseñarse de manera apropiada un método de producción dependiendo del péptido o proteína deseados. Otros objetos de la presente invención son proporcionar un método para producir un fragmento de péptido protegido (componente modificado) adecuado para la reacción de condensación en condiciones suaves que no influyen en la estructura del sitio modificado, y proporcionar un método para producir un fragmento de péptido protegido (componente modificado) adecuado para la condensación con un fragmento de péptido protegido (componente no modificado). Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir una proteína o péptido modificado fisiológicamente activo, que sea altamente seguro de manera suficiente para usarse como medicamento. En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un método industrial para producir una ghrelina y un derivado de ghrelina de una manera sencilla y eficaz.

Los presentes inventores han mejorado un método para sintetizar un fragmento de péptido que contiene un aminoácido que está modificado por un grupo acilo en ghrelina o un derivado de la misma (componente modificado), usando ghrelina como material, y han establecido un método por el que puede producirse un fragmento de péptido (componente modificado) de una manera más sencilla y eficaz. Es decir, los presentes inventores han encontrado un método en el que una secuencia de cadena principal peptídica de un fragmento de péptido (componente modificado) se construye en una resina escindible con ácido débil tal como una resina de 2-clorotritilo, etc., y entonces dicho péptido se trata, tras la modificación selectiva del residuo, con un ácido débil tal como ácido acético, por lo que un péptido protegido y modificado puede escindirse de la resina en fase sólida. Como técnica anterior, se conoce un método en el que se introduce un grupo modificado en una resina tal como una resina de Wang, que puede escindirse con ácido trifluoroacético, etc. de una resina, y luego se elimina un grupo protector cuando el péptido se escinde de la resina. Sin embargo, en dicho método, puesto que el fragmento de péptido escindido (componente modificado) se somete posteriormente a una reacción de condensación con otro fragmento de péptido (componente no modificado), debe introducirse de nuevo un grupo protector, y por tanto un método basado en la técnica anterior

por el que también se elimina al mismo tiempo un grupo protector con la escisión de la resina no es preferible desde el punto de vista de la producción sencilla y eficaz.

5 Dado estos factores, los presentes inventores llevaron a cabo estudios intensivos, y como resultado, han desarrollado un método en el que se usa un ácido débil (incluyendo un ácido fuerte diluido) que apenas elimina un grupo protector para una cadena lateral de aminoácido para escindir un fragmento de péptido (componente modificado) de una resina, mientras que se usa un fluoruro de amonio cuaternario como un método eficaz para modificar selectivamente un residuo mediante la eliminación de un grupo protector para una cadena lateral de aminoácido específico en una resina sin escindir el péptido de la resina. De manera convencional, entre los fluoruros de amonio cuaternarios, se ha usado fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) como reactivo para escindir un péptido de una resina en fase sólida (J. Chem. Soc., Chem. Commun., págs. 414-415, 1988, Tetrahedron Letters, vol. 34, págs. 7599-7602, 1993). Sin embargo, los presentes inventores descubrieron que un péptido construido en una resina escindible con ácido débil no se escinde de la resina mediante tratamiento con TBAF. Como resultado, cuando se usa TBAF, el péptido no se escinde de la resina, y por este motivo, puede eliminarse un grupo protector para una cadena lateral de aminoácido específico en una resina y puede modificarse selectivamente un residuo, y mediante la escisión de un fragmento de péptido (componente modificado) de una resina usando un ácido débil (incluyendo ácido fuerte diluido) que apenas elimina un grupo protector para una cadena lateral de aminoácido, se hace innecesaria una etapa de proteger un fragmento de péptido (componente modificado) de antemano para la siguiente etapa de reacción de condensación con un fragmento de péptido (componente no modificado). Por consiguiente, puede obtenerse un procedimiento de producción de una proteína o péptido modificado fisiológicamente activos de una manera más sencilla y eficaz.

Además, los presentes inventores mejoraron un método para preparar un fragmento de péptido protegido de ghrelina (componente no modificado), y descubrieron una secuencia de ligador que es óptima para la producción en masa de un fragmento de ghrelina (8-28) protegido, mediante un método de tratamiento enzimático en dos etapas. Además, los presentes inventores establecieron un método que puede simplificar considerablemente y hacer eficaz una etapa de producir un fragmento de péptido protegido (componente no modificado) mediante purificación en una condición de pH en la que no se elimina un grupo protector. Es decir, los presentes inventores descubrieron que el fenómeno de eliminación de un grupo protector en el momento de la preparación de un péptido protegido depende del pH y de la temperatura de la disolución acuosa, y que la eliminación de un grupo protector puede suprimirse ajustando el pH de la disolución acuosa a de 4 a 8, por lo que puede prepararse de manera eficaz un péptido protegido (componente no modificado).

Además, los presentes inventores mejoraron un método de condensación de cada fragmento de péptido, y desarrollaron un método de producción mediante el cual puede suprimirse la racemización en la activación y condensación de aminoácidos, y puede producirse una ghrelina o un derivado de ghrelina con calidad superior con un rendimiento superior. En particular, un método para producir ghrelina usando una resina escindible con ácido débil tiene la ventaja de que puede suprimirse la formulación de dicetopiperazina formada mediante una reacción secundaria. Es decir, puesto que un residuo de aminoácido C-terminal es prolina en la posición 7, puede minimizarse una reacción secundaria de eliminación de dicetopiperazina de una resina envolviendo dicetopiperazina cuando se condensa el tercer aminoácido (Leu) con un dipéptido (-Ser-Pro-).

Basándose en estos descubrimientos, los presentes inventores han descubierto que el método mencionado anteriormente puede aplicarse fácilmente también para la producción de péptidos o proteínas fisiológicamente activos que tienen diversas estructuras modificadas en las que un grupo acilo, un grupo fosfato o un grupo sulfato, ni que decir tiene un grupo alquilo, está unido a una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido a través de un enlace glicosídico, un puente disulfuro, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace amida o similares, y finalmente completarse la presente invención.

45 Concretamente, la presente invención se refiere a:

(1) un método para producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados representados por la fórmula 1; -A(R)- (en la que A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a la cadena lateral de A), que comprende usar una resina escindible con ácido débil,

50 (2) el método para producir un fragmento de péptido según (1), en el que (a) se prepara un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada de un aminoácido o/y un no aminoácido con una cadena lateral protegida en una resina escindible con ácido débil, (b) se desprotege un grupo protector para la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A que va a modificarse con un sustituyente R sin escindir el fragmento de péptido de la resina escindible con ácido débil, (c) se modifica la cadena lateral desprotegida con un sustituyente R, y (d) se escinde el fragmento de péptido de la resina escindible con ácido débil,

55 (3) el método para producir un fragmento de péptido según (1) o (2), en el que el grupo protector para la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A es un grupo protector de sililo, y se usa fluoruro de amonio cuaternario para desproteger el grupo protector,

- (4) el método para producir un fragmento de péptido según (3), en el que el grupo protector de sililo es t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), triisopropilsililo (TIPS), triisobutilsililo (TIBS), t-hexildimetilsililo (ThxDMS) o trifenilsililo (TPS), y el fluoruro de amonio cuaternario es fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), fluoruro de tetraetilamonio (TEF) o fluoruro de amonio,
- 5 (5) el método para producir un fragmento de péptido según uno cualquiera de los anteriores (1) a (4), en el que A es serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, y R está unido a una cadena lateral de A a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amido, un enlace O-glicosídico, un enlace N-glicosídico o similares,
- 10 (6) el método para producir un fragmento de péptido según (5) anterior, en el que A es serina o treonina, y R está unido a una cadena lateral de A a través de un enlace éster,
- (7) el método para producir un fragmento de péptido según (6) anterior, en el que el fragmento de péptido es ghrelina o un derivado de la misma, o una parte que contiene un aminoácido modificado en la ghrelina o un derivado de la misma,
- 15 (8) un método para producir una proteína o péptido modificado, que comprende (a) producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados representados por la fórmula 1; -A(R)- (en la que A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a una cadena lateral de A) usando una resina escindible con ácido débil, (b) producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, además del fragmento de péptido de (a), y condensar los
- 20 fragmentos de péptido producidos en (a) y (b),
- (9) el método para producir una proteína o péptido modificado según (8) anterior, en el que el fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados se produce mediante el método descrito en uno cualquiera de (2) a (4),
- 25 (10) el método para producir una proteína o péptido modificado según (8) o (9) anteriores, en el que A es serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, y R está unido a una cadena lateral de A a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amido, un enlace O-glicosídico o un enlace N-glicosídico,
- 30 (11) el método para producir una proteína o péptido modificado según (10) anterior, en el que A es serina o treonina, y R está unido a una cadena lateral de A a través de un enlace éster,
- (12) el método para producir una proteína o péptido modificado según (11) anterior, en el que la proteína o péptido modificado es ghrelina o un derivado de la misma,
- (13) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (8) a (12) anteriores, en el que la condensación de fragmentos de péptido se realiza mediante el uso de un agente de condensación,
- 35 (14) el método para producir una proteína o péptido modificado según (13) anterior, en el que el agente de condensación es hexafluorofosfato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), difenilfosforilazida (DPPA), difenilfosforocianidato (DEPC), diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC),
- 40 (15) el método para producir una proteína o péptido modificado según (13) anterior, en el que el agente de condensación es diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y la condensación de fragmentos de péptido usando el agente de condensación mencionado anteriormente se realiza en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), 1-hidroxisuccinimida (HOSu) o 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxobenzotriazina (HOObt).
- 45 Más específicamente, la presente invención se refiere a, en un procedimiento para producir una proteína o péptido modificado mediante condensación de fragmentos, (a) un método para producir una proteína o péptido modificado fisiológicamente activo, que comprende sintetizar un fragmento de péptido que contiene un grupo modificado usando una resina escindible con ácido débil tal como resina de 2-clorotritilo, (b) un método para producir un péptido o proteínas fisiológicamente activos que tienen modificación, particularmente ghrelina o un derivado de ghrelina, que
- 50 comprende producir un fragmento de péptido que contiene un grupo acilo, un grupo sulfato, etc. que se eliminan fácilmente con un ácido, usando una resina escindible con ácido débil tal como resina de 2-clorotritilo, (c) un método para producir ghrelina o un derivado de ghrelina, que comprende suprimir la racemización de un aminoácido constituyente con la mediación de prolina a una resina C-terminal de un fragmento lateral N-terminal que va a activarse, cuando se condensan un fragmento de péptido que contiene modificación (componente modificado) y un
- 55 fragmento de péptido que no contiene modificación (componente no modificado), y (d) un agente de condensación que es extraordinariamente apropiado para producir ghrelina o un derivado de ghrelina.

- Además, la presente invención se refiere a: (1) un método para producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, que comprende preparar, en una resina escindible con ácido débil, un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada que comprende aminoácidos o/y no aminoácidos, siendo al menos un aminoácido o no aminoácido de ellos un aminoácido o no aminoácido modificado, representados por la fórmula 1; -A(R)- (en la que A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a una cadena lateral de A que se introduce para modificación), y en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, están protegidos con un grupo protector, y escindir el fragmento de péptido de la resina escindible con ácido débil en condiciones débilmente ácidas sin eliminación del grupo protector en el fragmento de péptido,
- (2) el método para producir un fragmento de péptido según (1) anterior, que comprende (a) preparar, en una resina escindible con ácido débil, un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada que comprende aminoácidos o/y no aminoácidos, en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, están protegidos con un grupo protector, (b) desproteger el grupo protector sin escindir el fragmento de péptido de la resina escindible con ácido débil, cuando se introduce un grupo protector en un grupo funcional reactivo en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A que va a modificarse con un sustituyente R, (c) modificar la cadena lateral desprotegida con un sustituyente R, y (d) escindir el fragmento de péptido de la resina escindible con ácido débil en condiciones débilmente ácidas sin eliminación del grupo protector en el fragmento de péptido,
- (3) un método para producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, representados por la fórmula 1; -A(R)- (en la que A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a una cadena lateral de A), que comprende (a) producir, en una resina escindible con ácido débil, un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada de un aminoácido o/y un no aminoácido, y en el que uno o más sustituyente reactivos seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, están protegidos con un grupo protector, (b) escindir el fragmento de péptido de la resina con ácido débil sin eliminación de un grupo protector en el fragmento de péptido en condiciones débilmente ácidas, (c) desproteger un grupo protector para el sustituyente reactivo en la cadena lateral de al menos un aminoácido o no aminoácido A del fragmento de péptido escindido, y (d) modificar la cadena lateral desprotegida con un sustituyente R,
- (4) el método para producir un fragmento de péptido según (2) o (3) anteriores, en el que un grupo protector para un sustituyente reactivo en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A que va a modificarse mediante un sustituyente R es un grupo protector de sililo, y se usa un fluoruro de amonio cuaternario para desproteger el grupo protector,
- (5) el método para producir un fragmento de péptido según (4) anterior, en el que el grupo protector de sililo es t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), triisopropilsililo (TIPS), triisobutilsililo (TIBS), t-hexildimetilsililo (ThxDMS) o trifenilsililo (TPS), y el fluoruro de amonio cuaternario es fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), fluoruro de tetraetilamonio (TEF) o fluoruro de amonio,
- (6) el método para producir un fragmento de péptido según uno cualquiera de (1) a (5) anteriores, en el que A es serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, y R está unido a un grupo funcional reactivo en la cadena lateral de A a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amido, un enlace O-glicosídico o un enlace N-glicosídico,
- (7) el método para producir un fragmento de péptido según (6) anterior, en el que A es serina o treonina, y R está unido a un grupo hidroxilo en la cadena lateral de A a través de un enlace éster,
- (8) el método para producir un fragmento de péptido según (7) anterior, en el que el fragmento de péptido es ghrelina o un derivado de la misma, o un fragmento de péptido que contiene un aminoácido modificado en la ghrelina o un derivado de la misma,
- (9) un método para producir una proteína o péptido modificado, que comprende (a) preparar un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados mediante el método descrito en uno cualquiera de (1) a (8), (b) preparar un fragmento de péptido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, y en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, están protegidos, además del fragmento de péptido de (a), y condensar fragmentos de péptido preparados en (a) y (b),

- (10) el método para producir una proteína o péptido modificado según (9) anterior, en el que condensación de los fragmentos de péptido se realiza mediante el uso de un agente de condensación,
- 5 (11) el método para producir una proteína o péptido modificado según (10) anterior, en el que el agente de condensación es hexafluorofosfato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), difenilfosforilazida (DPPA), difenilfosforocianidato (DEPC), diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitlohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC),
- 10 (12) el método para producir una proteína o péptido modificado según (10) anterior, en el que el agente de condensación es diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitlohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y la condensación de los fragmentos de péptido (a) y (b) usando el agente de condensación se realiza en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxisuccinimida (HOSu) o 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxobenzotriazina (HOObt),
- 15 (13) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (9) a (12) anteriores, que comprende producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, mediante un método enzimático o/y un método de recombinación genética,
- (14) el método para producir una proteína o péptido modificado según (13) anterior, en el que el fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado se produce mediante un método que comprende;
- 20 etapa (1); una etapa de poner en cultivo una célula transformada con un vector de expresión que tiene una de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del fragmento de péptido (a continuación en el presente documento, denominado péptido deseado en el presente punto) y una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de fusión opcionalmente con un péptido protector añadido al péptido deseado a través de una secuencia de ligador, y recoger el péptido deseado o la proteína de fusión del cultivo;
- 25 etapa (2); una etapa de escindir y separar el péptido protector y, opcionalmente, una secuencia de ligador y el péptido deseado de la proteína de fusión resultante, y opcionalmente purificar adicionalmente el péptido deseado cuando la proteína de fusión se recoge en la etapa (1); y
- 30 etapa (3); una etapa de proteger, con un grupo protector, uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en la cadena lateral del péptido deseado obtenido en la etapa (1) o la etapa (2),
- 35 (15) el método para producir una proteína o péptido modificado según (14) anterior, en el que la escisión y separación del péptido protector y, opcionalmente, la secuencia de ligador y el péptido deseado en la etapa (2) se realiza en dos etapas usando una proteasa OmpT o un derivado de la misma y una proteasa Kex2 o un derivado de la misma,
- (16) el método para producir una proteína o péptido modificado según (14) o (15) anteriores, en el que la secuencia de ligador es una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27,
- 40 (17) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (13) a (16) anteriores, en el que el fragmento de péptido es un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido en ghrelina o un derivado de la misma,
- (18) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (13) a (17) anteriores, en el que el fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido se purifica y almacena en una disolución que tiene un pH de 4 a 8,
- 45 (19) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (13) a (18) anteriores, en el que el grupo protector es un grupo Boc,
- (20) un método para producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, que comprende producir el fragmento de péptido mediante un método que comprende:
- 50 etapa (1); una etapa de poner en cultivo una célula transformada con un vector de expresión que tiene una de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos deseada (a continuación en el presente documento, denominado péptido deseado en el presente punto) y una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de fusión opcionalmente con un péptido protector añadido al péptido deseado a través de una secuencia de ligador, y recoger el péptido deseado o la proteína de fusión del cultivo;
- etapa (2); una etapa de escindir y separar el péptido protector y, opcionalmente, la secuencia de ligador y el péptido deseado de la proteína de fusión resultante y, opcionalmente purificarla adicionalmente, cuando la proteína de fusión

se recoge en la etapa (1);

etapa (3); una etapa de proteger, con un grupo protector, uno o más sustituyente reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral del péptido deseado obtenido en la etapa (1) o (2); y

5 etapa (4); una etapa de purificar y almacenar el péptido protegido deseado obtenido en la etapa (3) en una disolución que tiene un pH de 4 a 8,

(21) el método para producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado según (20) anterior, en el que el grupo protector es un grupo Boc,

10 (22) el método para producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado según (20) o (21) anteriores, en el que la escisión y separación del péptido protector y, opcionalmente, la secuencia de ligador y el péptido deseado en la etapa (2) se realiza en dos etapas usando una proteasa OmpT o un derivado de la misma y una proteasa Kex2 o un derivado de la misma,

15 (23) el método para producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado según uno cualquiera de (20) a (22) anteriores, en el que la secuencia de ligador es una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27,

(24) el método para producir una proteína o péptido modificado según uno cualquiera de (20) a (23) anteriores, en el que el fragmento de péptido es un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido en ghrelina o un derivado de la misma.

## 20 Breve explicación de los dibujos

La figura 1A muestra un oligo-ADN sintético total y una secuencia de aminoácidos de h-grelina (8-28). La figura 1B muestra una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión h-grelina (8-28) que se expresa mediante el plásmido p117 8-28oRR.

25 La figura 2 muestra los resultados del análisis de HPLC de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) purificada. El pico a) indica el pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

La figura 3 muestra una reacción de condensación de fragmentos. El pico A indica el pico de [N<sup>α</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu)]h-grelina (1-7), el pico B indica el pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28), el pico C indica el pico de [N<sup>α</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu), Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina, y un pico D indica el pico de h-grelina.

La figura 4 muestra los resultados de la medición de HPLC de h-grelina purificada.

30 La figura 5 muestra secuencias de aminoácidos de proteínas de fusión que tienen sitios de reconocimiento de escisión diferentes de proteasa Kex2.

La figura 6 muestra los resultados del análisis de HPLC de la eficacia de escisión de Kex2 de proteínas de fusión respectivas preparadas en la figura 5.

35 La figura 6A muestra los resultados del análisis de HPLC tras la reacción de la enzima Kex2 de PR-h-grelina (8-28). La figura 6B muestra los resultados del análisis de HPLC tras una reacción de la enzima Kex2 de RR-h-grelina (8-28). La figura 6C muestra los resultados del análisis de HPLC tras la reacción de la enzima Kex2 de KR-h-grelina (8-28). El pico a) indica el pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) que contiene una secuencia de ligador. El pico b) indica el pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). El pico c) indica el pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (16-28).

40 La figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos de cada proteína de fusión de h-grelina (8-28) preparada para determina una proteína de fusión óptima para la incubación.

La figura 8A muestra la diferencia en los resultados de incubación entre diferente proteínas de fusión, y la figura 8B muestra la razón relativa de turbidez tras triturar las células hasta obtener turbidez antes de triturar las células de una disolución de cultivo usando cada proteína de fusión (diferencia debida a las proteínas de fusión).

La figura 9 muestra los resultados de la evaluación de estabilidad de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

45 La figura 10 muestra los resultados de la evaluación de estabilidad de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

## Mejor modo para llevar a cabo la invención

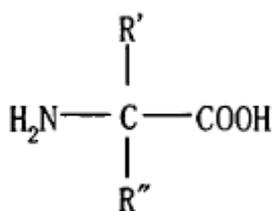
En la explicación de la presente invención, los términos usados en la presente invención se definen de la siguiente forma:

Un "aminoácido" se refiere a un compuesto que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo en la misma molécula, e

incluye todos los aminoácidos tales como un L-aminoácido, un D-aminoácido, un  $\alpha$ -aminoácido, un  $\beta$ -aminoácido, un  $\gamma$ -aminoácido, un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un aminoácido sintético y similares.

Un "aminoácido natural" se refiere a veinte tipos de aminoácidos codificados por genes.

- 5 Un "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto en el que un carbono  $\alpha$  en un  $\alpha$ -aminoácido se modifica con un sustituyente arbitrario que no está presente en un aminoácido natural o un D-aminoácido correspondiente. Es decir, cuando un  $\alpha$ -aminoácido se expresa mediante la siguiente fórmula;



- 10 un ejemplo del aminoácido no natural incluye un compuesto que tiene sustituyentes arbitrarios que no están presentes en un aminoácido natural o un D-aminoácido correspondiente, o un átomo de hidrógeno, como los sustituyentes representados por R' y R'', siempre que tanto R' como R'' no sean un átomo de hidrógeno.

- 15 Un "no aminoácido" se refiere a un análogo de un aminoácido que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, H, O, N y S, que no se incluye en un aminoácido natural y un aminoácido no natural. Entre otros, es preferible un compuesto que tiene una longitud de cadena molecular de una longitud de péptido o una longitud de dipéptido. Por ejemplo,  $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$ , que tienen todos ellos una longitud de péptido, o  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_4\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-(CH}_2)_3\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$ , que tienen todos ellos una longitud de dipéptido, se incluyen en el "no aminoácido" en la presente invención. En el presente documento,  $\text{R}_{11}$  representa una cadena lateral de un aminoácido natural. Los ejemplos de un "residuo de no aminoácido" en un péptido incluyen  $\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CO-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_2\text{-}$ , que tienen todos ellos una longitud de péptido, y  $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CO-}$ ,  $\text{-NH-(CH}_2)_4\text{-CO-}$ ,  $\text{-NH-C}(\text{CH}_3)_2\text{-(CH}_2)_3\text{-CO-}$ ,  $\text{-NH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO-}$ ,  $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_2\text{-}$ , que tienen todos ellos una longitud de dipéptido, y puede darse un caso en el que un enlace con un aminoácido adyacente no sea un enlace peptídico.

- 25 Un "péptido" o un "fragmento de péptido" se refiere a un compuesto en el que una pluralidad de aminoácidos están unidos mediante un enlace peptídico. En el presente documento, cuando está contenido un no aminoácido, se da un caso en el que un enlace entre el no aminoácido y un aminoácido adyacente no es un enlace peptídico. Sin embargo, un compuesto en este caso también se denomina colectivamente un péptido o un fragmento de péptido.

- 30 Un "fragmento de péptido protegido" se refiere a un fragmento de un péptido en el que uno o más sustituyentes reactivos seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo de la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido de un fragmento de péptido, que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido o la reacción de condensación de fragmentos de péptido, están protegidos con un grupo protector. A continuación en el presente documento, se abrevia como "fragmento de péptido protegido" en la presente memoria descriptiva.

- 35 Un "aminoácido o no aminoácido modificado" pueden representarse por la fórmula 1;  $\text{-A(R)-}$ , en la que A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a una cadena lateral de A, que se introduce para modificación.

- 40 Se da un caso en el que el sustituyente R está unido a un grupo formado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto o un grupo carboxilo en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, o un caso en el que el sustituyente R está unido directamente a un carbono  $\alpha$  de un aminoácido o un no ácido. El sustituyente R puede ser una cadena lateral modificada de un aminoácido o un no aminoácido.

- 45 No existe limitación para el sustituyente R. Los ejemplos de R incluyen un grupo representado por la fórmula 2;  $\text{-(CH}_2)_n\text{-P-Q}$  (en la que n indica un número entero de 1 a 10, P indica  $\text{-CO-}$ ,  $\text{-SO}_2\text{-}$ ,  $\text{-CO-O-}$ ,  $\text{-O-CO-}$ ,  $\text{-O-}$ ,  $\text{-CO-S-}$ ,  $\text{-S-CO-}$ ,  $\text{-CS-S-}$ ,  $\text{-S-CS-}$ ,  $\text{-S-}$ ,  $\text{-CO-NH-}$ ,  $\text{-NH-CO-}$ ,  $\text{-CO-NH-CO-}$ ,  $\text{-CS-NH-CS-}$ ,  $\text{-S-S-}$ ,  $\text{-CS-NH-}$  o  $\text{-NH-CS-}$ , y Q indica un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo que tiene de 1 a 35 átomos de carbono o preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono o un grupo aralquilo que tiene de 7 a 16 átomos de carbono), un grupo representado por la fórmula 3;  $\text{-P-Q}$  (en la que P y Q tienen el mismo significado tal como se definió anteriormente), y un grupo representado por la fórmula 4;  $\text{-Q}$  (en la que Q tiene el mismo significado tal como se definió anteriormente). Entre otros, cuando el sustituyente R está unido directamente a un carbono  $\alpha$  de un

- aminoácido o un no aminoácido, un ejemplo preferible de R incluye un grupo en el que un grupo alquilo que tiene de 1 a 35 átomos de carbono o preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, un grupo arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono o un grupo aralquilo que tiene de 7 a 16 átomos de carbono, se une con un enlace seleccionado del grupo que consiste en enlaces éster, éter, tioéster, tioéter, amido y carbamido opcionalmente a través de un grupo alquilo que tiene uno o más átomos de carbono. Cuando el sustituyente R está unido directamente a un carbono  $\alpha$  de un aminoácido o un no aminoácido, el sustituyente R no incluye un sustituyente unido a un carbono  $\alpha$  en un aminoácido natural. Cuando el sustituyente R está unido a un sustituyente reactivo en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, el sustituyente R es preferiblemente un grupo representado por la fórmula 4; -Q, en la que Q tiene el mismo significado tal como se definió anteriormente).
- En el presente documento, el “grupo alquilo” se refiere a un grupo alquilo cíclico, lineal o ramificado, y los ejemplos del mismo incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo ciclopropilo, un grupo butilo, un grupo sec-butilo, un grupo isobutilo, un grupo terc-butilo, un grupo ciclobutilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo ciclopentilo, un grupo hexilo, un grupo isohexilo, un grupo ciclohexilo, un grupo 3,3-dimetilbutilo, un grupo heptilo, un grupo 1-propilbutilo, un grupo octilo, un grupo nonilo, un grupo decilo, un grupo undecilo, un grupo dodecilo, un grupo tridecilo, un grupo tetradecilo, un grupo pentadecilo, y similares. Éstos pueden contener parcialmente un enlace de carbono insaturado, y el número de carbonos es de 1 a 35, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10.
- Los ejemplos del “grupo arilo” incluyen un grupo fenilo, un grupo 1- o 2-naftilo, un bifenilo, un grupo 1-, 2- o 9-antrilo, un grupo 1-, 2-, 3-, 4- o 9-fenantrilo, un grupo acenaftilo, un grupo antraceno, un grupo azuleno y similares. El número de carbonos es de 6 a 20, preferiblemente de 6 a 15.
- Los ejemplos del “grupo aralquilo” incluyen grupo bencilo, p-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, o-nitrobencilo, p-nitrobencilo, benzhidrilo, tritilo y similares. El número de carbonos es preferiblemente de 7 a 16.
- Además, estos grupo alquilo, grupo arilo y grupo aralquilo pueden tener un sustituyente que normalmente se usa en la técnica en una posición y un número químicamente aceptables.
- Como “aminoácido o no aminoácido modificado”, se prefiere el caso en el que el aminoácido o el no aminoácido A es serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, un ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, y un sustituyente R es un grupo representado por la fórmula 5;  $-(CH_2)_n-P^1-Q^1$  (en la que n tiene el mismo significado tal como se definió anteriormente;  $P^1$  representa un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amido, un enlace O-glicosídico o un enlace N-glicosídico; y  $Q^1$  tiene el mismo significado que el de Q mencionado anteriormente).
- Específicamente, por ejemplo, cuando un aminoácido A es serina, treonina, tirosina u oxiprolina, puesto que el aminoácido tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral, los ejemplos del “aminoácido modificado” incluyen serina, treonina, tirosina y oxiprolina en los que un grupo hidroxilo en la cadena lateral está eterizado o esterificado. Cuando un aminoácido A es cisteína, puesto que el aminoácido tiene un grupo mercapto en la cadena lateral, los ejemplos del “aminoácido modificado” incluyen cisteína en la que un grupo mercapto en la cadena lateral está tioeterizado, tioesterificado o disulfidizado. Cuando un aminoácido A es lisina, arginina o ácido 2,3-diaminopropiónico, puesto que el aminoácido tiene un grupo amino en una cadena lateral, los ejemplos del “aminoácido modificado” incluyen lisina, arginina o ácido 2,3-diaminopropiónico en los que un grupo amino en una cadena lateral está amidado, tioamidado, carbamidizado, tiocarbamidizado o alquilado. Cuando un aminoácido A es histidina, triptófano, prolina u oxiprolina, puesto que el aminoácido tiene un grupo amino en la cadena lateral, los ejemplos del “aminoácido modificado” incluyen histidina, triptófano, prolina u oxiprolina en los que un grupo amino en la cadena lateral está amidado, tioamidado, iminoeterizado, iminotioeterizado o alquilado.
- Entre otros, como “aminoácido o no aminoácido modificado”, es preferible serina o treonina en los que un grupo hidroxilo en la cadena lateral está esterificado.
- Además, cuando una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A contiene -OH, -SH, -NH- o -NH<sub>2</sub>, los ejemplos más preferibles del sustituyente R incluyen un grupo formado mediante la acilación de los mismos. Los ejemplos del grupo acilo incluyen por tanto un grupo formado mediante la eliminación de un grupo hidroxilo de ácido carboxílico orgánico, ácido sulfónico orgánico o compuestos de fosfato orgánico. El ejemplo más específico del ácido carboxílico orgánico incluye un ácido graso, y el número de carbonos es preferiblemente de 2 a 35, más preferiblemente de 6 a 18, lo más preferiblemente de 8 a 16. Los ejemplos del ácido graso incluyen ácidos grasos saturados tales como ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido butírico, ácido caproico, ácido undecílico, ácido palmítico, ácido decanoico, ácido nonadecanoico, ácido behénico, ácido montanoico, ácido lacérico, etc., y ácidos grasos insaturados tales como ácido acrílico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido ATEA roll, etc. El ácido graso insaturado puede ser monoeno o polieno. Entre otros, los ejemplos preferibles incluyen ácido octanoico (preferiblemente, ácido caprílico), ácido decanoico (preferiblemente, ácido cáprico), ácido dodecanoico (preferiblemente ácido láurico), etc. Con respecto al ácido sulfónico orgánico o compuesto de ácido fosfórico orgánico, el número de carbonos es preferiblemente de 2 a 35.

La “proteína o péptido modificado” se refiere a una proteína o un péptido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos que han experimentado la modificación mencionada anteriormente en un péptido o una proteína.

“Ghrelina” es un secretagogo de hormona de crecimiento (GHS) endógeno, y tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio en una célula y la actividad de inducir la secreción de hormonas de crecimiento. Entre otras, es preferible la ghrelina derivada de ser humano, rata, ratón, cerdo, ave, anguila, vaca, caballo, oveja, rana, trucha o perro. Los ejemplos más específicos de “ghrelina” incluyen una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 21, y en la que un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina en la posición 3 está sustituido con uno cualquiera de un grupo n-octanoílo, un grupo butanoílo, un grupo hexanoílo, un grupo decanoílo, un grupo dodecanoílo; o una proteína que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio en una célula, que tiene una secuencia de aminoácidos en la que de 1 a 10, preferiblemente de 1 a algunos aminoácidos están sustituidos, añadidos o delecionados en una parte distinta a la secuencia de los aminoácidos primero a cuarto N-terminales, en una secuencia de aminoácidos descrita en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 21, y en la que un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina en la posición 3 está sustituido con uno cualquiera de un grupo n-octanoílo, un grupo butanoílo, un grupo hexanoílo, un grupo decanoílo o un grupo dodecanoílo.

Los ejemplos del “derivado de ghrelina” incluyen un péptido que tiene la actividad de aumentar la concentración de ion calcio en una célula y que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Entre otros, es preferible un péptido que tiene al menos una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 4º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 5º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 6º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 7º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 8º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 9º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 10º aminoácido en una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, es preferible un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido, preferiblemente de 1 a 10 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a varios aminoácidos están delecionados, sustituidos y/o añadidos, en una parte distinta a una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 4º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 5º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 6º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 7º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 8º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 9º aminoácido, preferiblemente una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 10º aminoácido, en una secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID NOS: 1 a 21, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Entre otros, entre todos los péptidos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en las realizaciones mencionadas anteriormente, el más preferido es un aminoácido o un no aminoácido en los que los aminoácidos entre el extremo amino terminal y el 2º o el 3º aminoácidos, más preferiblemente entre el extremo amino terminal y el 3º aminoácido están modificados.

Además, una realización preferible incluye un péptido en el que una secuencia de entre el extremo amino terminal y el 4º aminoácido está sustituida con un fragmento de péptido representado por la fórmula 6; A-B-C-D- (en la que A indica un aminoácido, un no aminoácido o está ausente, B indica un aminoácido, un no aminoácido o está ausente, siempre que, una longitud de cadena molecular de A+B sea una longitud de dipéptido, y C y D pueden ser independientemente (a) un aminoácido modificado, (b) un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba o (c) un aminoácido que tiene una cadena lateral básica), en una secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID NOS: de 1 a 21 o en una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido, preferiblemente de 1 a 10 aminoácidos, más preferiblemente de 1 a varios aminoácidos están delecionados, sustituidos y/o añadidos en dicha secuencia de aminoácidos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos del “aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba” incluyen leucina, valina, norleucina, homoleucina, homoisoleucina, naftilalaninas, triptófano, fenilalanina, ciclohexilalanina, etc. o el N-metilaminoácido o el D-aminoácido de los mismos. Los ejemplos del “aminoácido que tiene una cadena lateral básica” incluyen lisina, arginina o histidina, o el D-aminoácido de los mismos. Entre otros, se prefiere un aminoácido en el que C es un aminoácido que ha experimentado la modificación mencionada anteriormente, y D es un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba en la fórmula 6 mencionada anteriormente.

En lugar del fragmento de péptido mencionado anteriormente representado por la fórmula 6; A-B-C-D-, puede usarse un fragmento de péptido representado por la fórmula 7; A<sup>1</sup>-B<sup>1</sup>-C<sup>1</sup>-D<sup>1</sup>-(en la que A<sup>1</sup> indica un aminoácido o un no aminoácido, preferiblemente un aminoácido natural o un D-aminoácido del mismo; al menos uno de B<sup>1</sup> o C<sup>1</sup> es un aminoácido o no aminoácido modificado y, cuando sólo uno de B<sup>1</sup> o C<sup>1</sup> es un aminoácido o no aminoácido modificado, el otro es un aminoácido o no aminoácido no modificados, preferiblemente un aminoácido natural o un D-aminoácido del mismo (una longitud de cadena molecular de A<sup>1</sup> + B es una longitud de dipéptido; y D<sup>1</sup> indica un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba o un aminoácido que tiene una cadena lateral básica).

Además, en lugar del fragmento de péptido mencionado anteriormente representado por la fórmula 6; A-B-C-D-, puede usarse un fragmento de péptido representado por la fórmula 8; B<sup>2</sup>-C<sup>2</sup>-D<sup>2</sup>-(en la que B<sup>2</sup> es un no aminoácido que tiene una longitud de dipéptido, C<sup>2</sup> es un aminoácido o no aminoácido modificado y D<sup>2</sup> indica un aminoácido que

tiene una cadena lateral hidrófoba o un aminoácido que tiene una cadena lateral básica).

Además, con respecto al "derivado de ghrelina", puede modificarse el extremo amino terminal o el extremo carboxilo terminal de un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable en la realización mencionada anteriormente. Específicamente, es preferible que se una adicionalmente un aminoácido básico a un extremo carboxilo terminal de un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la realización mencionada anteriormente. Además, es preferible que se modifique un extremo amino terminal de un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la realización mencionada anteriormente con un grupo alquilo o un grupo acilo saturado o insaturado que tiene uno o más átomos de carbono y/u OH de un grupo carboxilo del extremo carboxilo terminal se convierta en OZ o NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (en la que Z es un catión farmacéuticamente aceptable o un grupo alquilo inferior ramificado o no ramificado, y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan cada uno independientemente un grupo seleccionado del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo inferior ramificado o lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono). Además, estas modificaciones pueden combinarse.

Un método para producir una proteína o péptido modificado de la presente invención comprende tres etapas de (a) producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados usando una resina escindible con ácido débil, (b) producir por separado un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, además del fragmento de péptido protegido de (a), y (c) condensar los fragmentos de péptido protegidos producidos en (a) y (b).

Cada etapa en la producción de una proteína o péptido modificado se describirá más específicamente más adelante.

Puesto que una proteína o péptido modificado obtenido mediante el método de producción de la presente invención, o un fragmento del mismo, es peptídico, puede sintetizarse mediante métodos de síntesis de péptidos conocidos *per se*. En el presente documento, una proteína o péptido modificado, o un fragmento del mismo, incluye compuestos en los que estos grupos funcionales reactivos están protegidos con un grupo protector. Un método de síntesis de péptidos puede realizarse, por ejemplo, según cualquiera de un método de síntesis en fase sólida y un método de síntesis en fase líquida. Es decir, puede producirse un péptido deseado mediante la condensación de un péptido parcial o aminoácidos que pueden constituir una proteína o péptido modificado en bruto, o un fragmento del mismo, con una parte restante, seguido por la eliminación de un grupo protector cuando un producto tiene un grupo protector. Los ejemplos del método de condensación y un método de eliminación de un grupo protector conocidos incluyen métodos descritos en las siguientes publicaciones 1 a 3.

1. Nobuo Izumiya *et al.* "Basic and Experiment of Peptide Synthesis" publicado por Maruzen Co., Ltd. (1985)

2. Haruaki Yajima y Shunpei Sakakibara "Biochemistry Experimental Course 1, Protein Chemistry IV" editado por la Sociedad Bioquímica Japonesa, publicado por Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd. (1977)

3. "Development of Medicament, Sequel, vol. 14, Peptide Synthesis" supervisado por Haruaki Yajima publicado por Hirokawashoten.

Una etapa de producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados comprende usar síntesis química en fase sólida de la extensión de una cadena peptídica en una resina escindible con ácido débil. Más específicamente, puede obtenerse un fragmento de péptido deseado protegido mediante la condensación de aminoácidos o no aminoácidos en los que un grupo  $\alpha$ -amino y grupos funcionales reactivos en la cadena lateral que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido están protegidos de manera apropiada en una resina escindible con ácido débil según una secuencia de un fragmento de péptido deseado según diversos métodos de condensación conocidos *per se* y la escisión del fragmento de péptido protegido producido de la resina escindible con ácido débil sin eliminación de un grupo protector.

La resina escindible con ácido débil se refiere a una resina usada en la síntesis de péptidos, que puede escindir un fragmento de péptido preparado en una resina de la resina en condiciones débilmente ácidas. Por ejemplo, como resina escindible con ácido débil, la preferida es una resina que puede escindir, de la resina, un fragmento de péptido preparado en la resina, en una disolución que contiene uno o más compuestos que comprenden el grupo que consiste en ácidos carboxílicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido fórmico, y alcoholes fluorados tales como trifluoroetanol y hexafluoroisopropanol. Los ejemplos más específicos de la resina escindible con ácido débil incluyen resina a base de tritilo tal como resina de 2-clorotritilo, resina de tritilo, resina de 4-metiltritilo, resina de 4-metoxitritilo, resina de Rink Amide Barlos, etc., y resina de Sieber Amide y similares.

Un grupo protector para un grupo  $\alpha$ -amino y un grupo funcional reactivo en una cadena lateral (a continuación en el presente documento, denominada simplemente grupo funcional de cadena lateral) no está particularmente limitado. Los ejemplos de un grupo protector para un grupo  $\alpha$ -amino incluyen un grupo alcóxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como t-butoxicarbonilo (Boc), tricloroetiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxicarbonilo, tricloroetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo y piridin-4-metoxicarbonilo; un grupo cicloalquiloxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como cicloheptiloxicarbonilo y ciclohexiloxicarbonilo; un grupo aralquiloxicarbonilo tal como benciloxicarbonilo (Z), p-

5 metoxibenciloxicarbonilo (pMZ), p-clorobenciloxicarbonilo (Cl-Z), p-bromobenciloxicarbonilo (Br-Z), p-nitrobenciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 2-fenilisopropiloxicarbonilo, p-metilfenilisopropiloxicarbonilo, p-bifenilisopropiloxicarbonilo, y 3,5-dimetoxi- $\alpha,\alpha$ -dimetilbenciloxicarbonilo; un grupo aralquilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como bencilo (Bzl), benzhidrido y tritilo; un grupo acilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo (Ts), o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo y 3-nitro-2-piridilsulfenilo; ditasuccinoilo, 2-nitrofenilitio, difenilfosfinilo, difenilfosfinotioilo y dimetilfosfinotioilo.

10 Un grupo hidroxilo de serina y similar puede protegerse con un grupo alcanilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tal como un grupo acetilo, un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo y un grupo derivado de ácido carbónico tal como un grupo benciloxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo etc.

15 Un grupo guanidino de arginina puede protegerse, por ejemplo, con un grupo nitro, un grupo Z, un grupo Ts, un grupo p-metoxibencenosulfonilo (Mbs), un grupo 4-metoxi-2,6-dimetilbencenosulfonilo (Mds), un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr), un grupo mesitileno-2-sulfonilo (Mts), un grupo 2,3,4,5,6-pentametilbencenosulfonilo (Pme), un grupo 2,4,6-trimetoxibencenosulfonilo (Mtb), un grupo 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo (Pmc) o un grupo 2,2,9,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf).

Además, un grupo mercapto de cisteína puede protegerse, por ejemplo, con un grupo tritilo, un grupo acetamidometilo (Acm), un grupo terc-butilo, un grupo bencilo, un grupo p-metilbencilo, un grupo p-metoxibencilo, un grupo 3-nitro-2-piridinsulfenilo o un grupo butiltio.

20 Como grupo protector para un grupo imidazolilo de histidina, se usan, por ejemplo, un grupo Boc, un grupo tritilo (Trt), un grupo Ts, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, un grupo 2,4-dinitrofenol (DNP), un grupo benciloximetilo (Bom), un grupo t-butoximetilo (Bum) y un grupo Fmoc. Además, un grupo indolilo de triptófano puede protegerse, por ejemplo, con un grupo formilo, un grupo Z, un grupo 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, un grupo tricloroetiloxicarbonilo, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo o un grupo 2,4,6-trimetoxibencenosulfonilo.

25 Una reacción de condensación mediante una síntesis en fase sólida puede realizarse mediante cualquiera de un método de elongación gradual de condensación de aminoácidos uno por uno en una resina escindible con ácido débil, una condensación de fragmentos de condensación de un fragmento de péptido compuestos por dos o más aminoácidos, y una combinación de los mismos. El fragmento de péptido compuesto por dos o más aminoácidos puede producirse a partir de los aminoácidos respectivos mediante la síntesis en fase líquida o sólida convencional.

30 En primer lugar, se activan un aminoácido o un no aminoácido que tiene el grupo  $\alpha$ -amino mencionado anteriormente y un grupo funcional protegido de manera apropiada en la cadena lateral (a continuación en el presente documento, abreviado como aminoácido protegido, a menos que se indique otra cosa), y se condensa una resina escindible con ácido débil con el aminoácido protegido activado. En la condensación, un disolvente usado para la activación de un aminoácido protegido o para la condensación con la resina se selecciona de manera apropiada de los disolventes conocidos en un método de condensación de péptidos. Por ejemplo, se usan amidas de ácido tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y N-metilpirrolidona; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno y cloroformo; alcoholes tales como trifluoroetanol y fenol; sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido; ésteres tales como piridina, dioxano y tetrahidrofurano; nitrilos tales como acetonitrilo y propionitrilo; ésteres tales como acetato de metilo y acetato de etilo, y una mezcla apropiada de los mismos. Una temperatura de reacción puede ser igual que la temperatura de reacción de una reacción de formación de enlace peptídico, y habitualmente se selecciona de manera apropiada de un intervalo de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ . Un aminoácido protegido activado se usa habitualmente en una cantidad en exceso de 1 a 4 veces. Cuando se encuentra que la condensación es insuficiente como resultado de una prueba que usa una reacción de ninhidrina, puede obtenerse condensación suficiente repitiendo una reacción de condensación sin eliminación de un grupo protector. Cuando no se logra condensación suficiente ni siquiera cuando se repite una reacción, es posible no tener influencia sobre una reacción posterior mediante la acetilación de un aminoácido protegido que no ha reaccionado usando anhídrido acético o acetilimidazol.

Entonces, un aminoácido protegido se condensa con un aminoácido protegido condensado con una resina escindible con ácido débil según una secuencia deseada. Puede realizarse una reacción de condensación de cada aminoácido protegido mediante el método convencional tal como un método de activación del extremo C-terminal y un método de acoplamiento usando un reactivo de acoplamiento. El método de activación del extremo C-terminal incluye un método de éster activo y un método de anhídrido de ácido simétrico. Los ejemplos de un éster activo de este tipo usado en el método de éster activo incluyen ésteres alquílicos tales como éster cianometílico; ésteres fenílicos tales como éster tiofenílico, éster p-nitrotiofenílico, éster p-metanosulfonilfenílico, éster p-nitrofenílico, éster 2,4-dinitrofenílico, éster 2,4,6-triclorofenílico y éster pentaclorofenílico; imidésteres de ácido dicarboxílico tales como 1-hidroxisuccinimida (HOSu), imidoéster de ácido N-hidroxifáltico y imida de ácido N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboxilílico (HONB); derivados de hidroxilamina tales como éster de 8-hidroquinolina, éster de N-hidroxipiperidina y éster de 2-hidroxipiridina.

55 Ejemplos del método de acoplamiento usando un reactivo de acoplamiento incluyen un método de carbodiimida usando diciclohexilcarbodiimida (DCC), y una carbodiimida soluble en agua (WSC); un método aditivo de DCC; un

método de carbonildimidazol (CDI); un método que usa sal de isooxazolio tal como un reactivo de Woodward (3'-sulfonato de N-etil-5-fenilisooxazolio) y trifluoroborato de N-etil-2'-hidroxibencilisooxazolio, 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroxiquinolina (EEDQ), 1-etoxicarbonil-2-isobutoxi-1,2-dihidroxiquinolina (IIDQ), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) o difenilfosforilazida (DPPA).

La carbodiimida soluble en agua (WSC) usada en el método de carbodiimida incluye EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, N-ciclohexil-N'-morfolinoetilcarbodiimida y N-ciclohexil-N'-(N,N-dietilamino)ciclohexilcarbodiimida. La carbodiimida soluble en agua puede ser una sal tal como clorhidrato.

Además, el método aditivo de DCC incluye un método de DCC-HOSu, un método de DCC-HOBt (1-hidroxibenzotriazol), un método de DCC-HONB, un método de 2-hidroxiimino-2-cianoacetato de DCC-etilo, un método de WSC-HOSu y un método de WSC-HOBt.

Una reacción de condensación preferible incluye un método de carbodiimida, un método de éster activo y un método aditivo de DCC. Un método de condensación preferible adicionalmente incluye un método de prevenir la recemización tal como un método de éster activo y un método aditivo de DCC (por ejemplo el método de DCC-HOBt, el método de DCC-HOSu, el método de WSC-HOSu, el método de WSC-HOBt, etc.).

Un fragmento de péptido protegido deseado contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados. Como un método de insertar un aminoácido o no aminoácido modificado en una cadena peptídica, existen los 2 métodos siguientes.

Como primer método, existe un método de modificar específicamente una cadena lateral de un aminoácido o no aminoácido deseado de antemano, e introducir tal aminoácido o no aminoácido (a continuación en el presente documento, denominado un aminoácido o no aminoácido modificado específicamente en un residuo) en la fase de extensión de una cadena peptídica. Más específicamente, puede sintetizarse un aminoácido o no aminoácido modificado específicamente en un residuo (incluyendo compuestos de los que se protege el grupo  $\alpha$ -amino) mediante el método de síntesis conocido *per se*. Ejemplos de un método de este tipo incluyen esterificación, amidación, eterización, acilación y alquilación, y éstos se realizan mediante métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Además, esto puede introducirse en una cadena peptídica mediante uno cualquiera de los métodos de condensación mencionados anteriormente. En este caso, se selecciona de manera apropiada la eliminación de un fragmento de péptido protegido de la resina escindible con ácido débil de condiciones descritas más adelante y, preferiblemente, se selecciona de manera adecuada la eliminación de condiciones en las que no se elimina un sustituyente R de una cadena lateral de un aminoácido o no aminoácido modificado específicamente en un residuo

Como segundo método, existe un método de preparar un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada que comprende un aminoácido o/y un no aminoácido mediante el método mencionado anteriormente y, después, modificar específicamente una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido deseado (a continuación en el presente documento, denominado una modificación específica de residuo). El método de modificación específica de residuo no está particularmente limitado, sino que puede usarse el método conocido. Los ejemplos del método incluyen esterificación, amidación, eterización, acilación y alquilación, y éstos se realizan mediante métodos bien conocidos por un experto en la técnica. Además, un método de modificación mediante fosforilación incluye métodos descritos en Tetrahedron Letters, vol.41, págs. 4457-4461, 2000 o Biopolymers, vol. 60, págs. 3-31, 2001. Un método de modificación mediante azúcar incluye métodos descritos en Int. J. Peptide Protein Res., vol. 42, págs. 165-170, 1993, Science, vol. 291, págs. 2344-2350, 2001, o Science, vol. 291, págs. 2357-2364, 2001.

Un método de este tipo puede clasificarse en los dos métodos siguientes. Es decir, cuando un grupo funcional de una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido que va a modificarse específicamente en un residuo se protege con un grupo protector, el método puede clasificarse de manera aproximada en el caso en que, en la desprotección de tal grupo protector, se escinde un fragmento de péptido protegido de una resina al mismo tiempo, y el caso en que en la desprotección de tal grupo protector, no se escinde un fragmento de péptido protegido de la resina. En el primer caso, puede obtenerse un fragmento de péptido deseado protegiendo un grupo carboxilo C-terminal con un grupo protector, realizando una modificación específica de residuo mediante el método de síntesis conocido *per se*, y después desprotegiendo el grupo carboxilo C-terminal seleccionando de manera apropiada un método de los métodos descritos posteriormente. En el segundo caso, la modificación específica de residuo puede realizarse en una resina mediante el método sintético conocido *per se*, y después puede eliminarse un fragmento de péptido deseado de una resina seleccionando de manera apropiada un método de los métodos descritos posteriormente.

En la presente invención, lo más preferible es un método en el que un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada que comprende un aminoácido o/y un no aminoácido se prepara mediante el método mencionado anteriormente, después, cuando un grupo funcional reactivo de una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido va a modificarse específicamente en un residuo, se protege con un grupo protector, el grupo protector se desprotege, se realiza la modificación específica de residuo en una resina mediante el método sintético conocido *per se* y, luego se realiza la eliminación de un fragmento de péptido protegido de la resina escindible con ácido débil descrito posteriormente y, opcionalmente, la desprotección de cada grupo protector.

En el método mencionado anteriormente, un grupo protector para un aminoácido o un no aminoácido que va a modificarse específicamente en un residuo no está particularmente limitado siempre y cuando un fragmento de péptido protegido no se escinda de una resina en la desprotección de un grupo protector de este tipo, sino que los ejemplos preferibles incluyen grupos sililo tales como un grupo t-butildimetilsililo y un grupo t-butildifenilsililo. En la desprotección de tal grupo protector, se usa un reactivo que puede desproteger específicamente un grupo protector para un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido que va a modificarse específicamente en un residuo sin escindir un fragmento de péptido protegido de una resina. Tal reactivo se selecciona de manera apropiada dependiendo del tipo de resina escindible con ácido débil y del grupo protector, y cuando el grupo protector es un grupo sililo, preferiblemente se usa fluoruro de amonio cuaternario, y más preferiblemente se usa fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF).

Si se selecciona un grupo protector tal como se describió anteriormente, cuando se desprotege un grupo amino N-terminal con el fin de efectuar la condensación para una extensión de péptido, no se elimina un grupo protector para un grupo funcional de cadena lateral de cada aminoácido protegido y no se escinde un fragmento de péptido protegido de una resina escindible con ácido débil y, cuando se elimina una resina escindible con ácido débil de la resina unida al péptido resultante, no se elimina un grupo protector para un grupo funcional de cadena lateral de cada residuo de aminoácido. Además, debido a esto, puede suprimirse la producción de un subproducto. Por este motivo, puede obtenerse un fragmento de péptido en el que un grupo funcional de cadena lateral se protege con un grupo protector de manera sencilla y con alta pureza y alto rendimiento. Puesto que este fragmento de péptido tiene un grupo funcional de cadena lateral protegido, no es necesario introducir de nuevo un grupo protector, y el fragmento puede usarse preferiblemente como material de partida para la preparación de una proteína o péptido modificado deseado mediante un método en fase líquida en la siguiente etapa.

Finalmente, un fragmento de péptido protegido así obtenido es escinde de una resina escindible con ácido débil. Con ello, se realiza la escisión en condiciones débilmente ácidas con lo que no se desprotege un grupo protector en un fragmento de péptido protegido, es decir, un grupo protector para un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido. La condición débilmente ácida incluye la condición en la que una resina escindible con ácido débil se suspende en una disolución que contiene ácidos carboxílicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido fórmico, y/o alcoholes fluorados tales como trifluoroetanol y hexafluoroisopropanol. Específicamente, el fragmento de péptido protegido así obtenido puede escindirse de una resina escindible con ácido débil mediante la agitación en la disolución mencionada anteriormente durante un tiempo deseado, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a 4 horas, más preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a 2 horas. Más específicamente, la escisión puede realizarse según el método conocido descrito en un método de Barlos *et al* (Tetrahedron Lett, Vol. 30, págs. 3947, 1989), por ejemplo, un método de suspensión en un disolvente tal como ácido trifluoroacético al 0,5%/diclorometano, o ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano = 1/2/7, o ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano = 2/2/6.

En la presente invención, también puede prepararse un fragmento de péptido que contiene un aminoácido o no aminoácido modificado mediante la escisión de un fragmento de péptido protegido de una resina escindible con ácido débil sin introducir un aminoácido o no aminoácido modificado en una cadena peptídica, seguido por una modificación específica de residuo de un residuo de aminoácido deseado. El método de modificación específico de residuo es tal como se describió anteriormente.

El método de producción mencionado anteriormente puede aplicarse a un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, sin limitación. Entre otros, es preferible que el método mencionado anteriormente se use en preparar un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados representados mediante la siguiente fórmula 9, o una sal de los mismos.

Es decir, es un péptido representado por la fórmula 9;  $(R_1)_n$ -Gly-Ser(X1)-A(R)-Phe-Leu-Ser(X2)-Pro-OR2 (en la que -A(R)- es el aminoácido o no aminoácido mencionado anteriormente que ha experimentado modificación. Entre otros, A es preferiblemente serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, R es preferiblemente un grupo de modificación tal como un grupo acilo, un azúcar, un grupo fosfato, un grupo sulfato, un grupo alquilo, un grupo aralquilo y un grupo aroilo, y es preferible que R esté unido a un sustituyente reactivo de una cadena lateral de A a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amido, un enlace O-glicosídico o un enlace N-glicosídico.

R1 indica un grupo alcoxycarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como t-butoxicarbonilo (Boc), tricloroetiloxycarbonilo, t-amiloxycarbonilo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), metilsulfoniletoxycarbonilo, tricloroetoxycarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo y piridin-4-metoxycarbonilo; un grupo cicloalquilo oxycarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como cicloheptiloxycarbonilo y ciclohexiloxycarbonilo; un grupo aralquilo oxycarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como benciloxycarbonilo (Z), p-metoxibenciloxycarbonilo (pMZ), p-clorobenciloxycarbonilo (Cl-Z), p-bromobenciloxycarbonilo (Br-Z), p-nitrobenciloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, 2-fenilisopropiloxycarbonilo, p-metilfenilisopropiloxycarbonilo, p-bifenilisopropiloxycarbonilo y 3,5-dimetoxi- $\alpha$ , $\alpha$ -dimetilbenciloxycarbonilo; un grupo aralquilo que tiene opcionalmente un sustituyente tal como bencilo (Bzl), benzhidrilo, y tritilo; un grupo acilo tal como trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo (Ts), o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo y 3-nitro-2-piridilsulfenilo;

ditiasuccinoilo, 2-nitrofenilitio, difenilfosfinilo, difenilfosfinitioilo o dimetilfosfinitioilo,

n es 1 ó 2,

5 X1 y X2 indican un grupo protector para un grupo hidroxilo de una cadena lateral de serina, e indican un grupo alcanoilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tal como un grupo acetilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; un grupo derivado de ácido carbónico tal como un grupo benciloxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo, o como un grupo adecuado para la eterificación que une el sustituyente mencionado anteriormente R a una cadena lateral a través de un enlace éter, indica un grupo t-butilo, un grupo bencilo, un grupo tetrahidropirano, un grupo tritilo o un grupo sililo tal como un grupo t-butildimetilsililo,

10 R2 indica un grupo protector o la ausencia de un grupo protector y, cuando hay un grupo protector, indica un grupo éster alquílico (por ejemplo un grupo éster alquílico lineal, ramificado o cíclico tal como éster metílico, éster etílico, éster propílico, éster butílico, éster t-butílico, éster ciclopentílico, éster ciclohexílico, éster cicloheptílico, éster ciclooctílico y éster 2-adamántico), un grupo éster aralquílico (por ejemplo grupo éster bencílico, éster 4-nitrobencílico, éster 4-metoxibencílico, éster 4-clorobencílico o éster benzhidrílico), un grupo éster fenacílico, un grupo benciloxicarbonilhidrazida, un grupo t-butoxicarbonilhidrazida y un grupo tritilhidrazida)

15 o una sal de los mismos.

En la fórmula 9, R1 es preferiblemente un grupo Boc, un grupo Z, un grupo pMZ o un grupo Fmoc, y los ejemplos de un grupo protector representado por X1 y X2 incluyen preferiblemente un grupo t-butilo y un grupo 3,4-bencilo, más preferiblemente un grupo t-butilo. Como R2, es preferible hidrógeno o un grupo tioéster.

20 Además, el método de producción mencionado anteriormente puede usarse de manera adecuada en la preparación de ghrelina, preferiblemente ghrelina humana, de rata, de ratón, porcina, de pollo, de anguila, bovina, equina, ovina, de rana, trucha o canina, o un derivado de ghrelina. Además, el método de producción mencionado anteriormente se usa de manera adecuada en la preparación de una parte que contiene un aminoácido o no aminoácido modificado en la ghrelina o derivado de ghrelina. En la tabla 1 se describen estructuras de ghrélinas de los organismos respectivos.

25 Más específicamente, el método de producción mencionado anteriormente es útil en la preparación de un fragmento de péptido (a) que comprende una secuencia de al menos aminoácidos primero a cuarto del extremo N-terminal en una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 21, preferiblemente comprende una secuencia de los aminoácidos primero a quinto del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, o comprende una secuencia de los aminoácidos primero a séptimo del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, (b) en el que un grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina que es el tercer aminoácido del extremo N-terminal está acilado, preferiblemente acilado con un grupo acilo saturado o insaturado que tiene un número de carbonos de 2 a 35, preferiblemente de 6 a 18, y (c) en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido, seleccionados del grupo que consiste en grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido, preferiblemente un grupo hidroxilo y un grupo amino están protegidos con un grupo protector.

En la presente invención, se prepara un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado además del fragmento de péptido protegido mencionado anteriormente que contiene un aminoácido o no aminoácido modificado.

40 Un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido que ha experimentado modificación tal como acilación, glicosilación y fosforilación, de un péptido o una proteína en la presente invención puede producirse mediante la técnica de recombinación genética o método enzimáticos conocidos *per se*. Por ejemplo, puede prepararse mediante un método que comprende una etapa de poner en cultivo una célula transformada con un vector de expresión que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del fragmento de péptido mencionado anteriormente (a continuación en el presente documento, denominado péptido deseado), recoger el péptido deseado del cultivo, y una etapa de proteger, con un grupo protector, un grupo funcional que pueden producir una reacción secundaria no deseada, entre grupos funcionales de cadena lateral del péptido deseado obtenido en la etapa mencionada anteriormente. Un método para construir un vector de expresión puede realizarse mediante el método convencional en la técnica. Para la construcción de un vector de expresión, como otros elementos necesarios para expresar altamente el péptido deseado, por ejemplo, un promotor, un terminador y un sitio de corte y empalme, también pueden usarse de manera adecuada los ya conocidos en el método convencional. Una célula huésped que se transforma con el vector de expresión no está particularmente limitada, sino que puede usarse una célula huésped seleccionando de manera apropiada una célula que puede expresar de manera adecuada una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido deseado de una célula procariota y una célula eucariota, por ejemplo, una célula de microorganismo tal como *Escherichia coli*, levadura y una célula de animal que ya se han usado en el método convencional. La protección de un grupo funcional de cadena lateral del péptido deseado puede realizarse mediante el método mencionado anteriormente.

Un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido puede producirse mediante un método que comprende:

5 etapa (1); (a) una etapa de poner en cultivo una célula transformada con un vector de expresión que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de fusión opcionalmente con un péptido protector añadido al péptido deseado a través de una secuencia de ligador y recoger la proteína de fusión del cultivo;

etapa (2); una etapa de escindir y separar un péptido protector y, opcionalmente, una secuencia de ligador y el péptido deseado de la proteína de fusión obtenida en la etapa (1), seguido por purificación adicional opcional; y

etapa (3); una etapa de proteger, con un grupo protector, un grupo funcional que pueden producir una reacción secundaria no deseada entre grupos funcionales de cadena lateral del péptido deseado obtenido en la etapa (2).

10 Se usa un péptido protector para el fin de suprimir la degradación del péptido deseado mediante una enzima en una célula huésped, y un péptido de este tipo no está particularmente limitado en lo que respecta al fin que puede lograrse, sino que puede usarse un fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos relacionada con  $\beta$ -galactosidasa derivada de *Escherichia coli*. Un experto en la técnica conoce la secuencia de aminoácidos relacionada con dicha enzima y un experto en la técnica usa ampliamente un fragmento de péptido derivado de  $\beta$ -galactosidasa como péptido protector en un método de proteínas de fusión.

15 Una secuencia de ligador es una secuencia que se inserta entre un péptido protector y el péptido deseado cuando no se realizan de manera apropiada la escisión y la separación de un péptido protector y el péptido deseado, por ejemplo, cuando no hay ninguna enzima adecuada para escindir y separar un péptido protector y el péptido deseado en la etapa (2). Por tanto, la secuencia de dicho péptido protector puede seleccionarse de manera apropiada de modo que la escisión y la separación de una secuencia de ligador y el péptido deseado se realicen de manera apropiada en la etapa (2).

La escisión y la separación de un péptido protector y, opcionalmente, una secuencia de ligador y el péptido deseado pueden realizarse mediante un método enzimático y/o químico.

20 Como métodos de escisión enzimáticos y químicos, también puede usarse el método descrito en Methods in ENZYMOLOGY, vol. 185, Gene Expression Technology, editado por David V. Goeddel, publicado por ACADEMIC PRESS, INC).

25 Los ejemplos de un método de escisión química incluyen un método para escindir un lado C-terminal de metionina con bromuro de cianógeno (D.V. Goeddel *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, págs. 106-110, 1979), un método para escindir entre una secuencia de -Asp-Pro- con ácido fórmico (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 40, págs. 1173, 1970), un método para escindir entre una secuencia de -Asn-Gly- con hidroxilamina, y un método para escindir un lado C-terminal de tripsina con escatol-BNPS o N-clorosuccinimida. Por ejemplo, cuando no está contenida metionina en una secuencia de aminoácidos relacionada con el péptido deseado, la escisión en un sitio de escisión puede realizarse químicamente mediante tratamiento con bromuro de cianógeno introduciendo metionina en un extremo de una región de sitio de escisión adyacente al péptido deseado.

30 Además, como método de escisión enzimático, puede ajustarse una región de sitio de escisión que puede reconocerse específicamente como sustrato por una enzima usada para el tratamiento de escisión. Los ejemplos de los mismos incluyen un método para escindir un enlace peptídico en un centro de un par de aminoácidos básicos de arginina-arginina, lisina-lisina, arginina-lisina y lisina-arginina, o un enlace peptídico en un centro de un par de aminoácidos de arginina-metionina, arginina-alanina o arginina-valina con una proteasa OmpT de *Escherichia coli* (Sugimura, K. y Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988), un método para escindir entre una secuencia de -X-Gly-en una secuencia de X-Gly o Pro-X-Gly-Pro con colagenasa (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, págs. 4692-4696, 1984), un método para escindir un lado C-terminal de Lys en la secuencia de -Asp-Asp-Asp-Lys- (SEQ ID NO: 22) con enterocinasa, un método para escindir un lado C-terminal de Arg en una secuencia de -Ile-Glu-Gly-Arg- (SEQ ID NO: 23) con el factor Xa de coagulación sanguínea (documento JP-A n.º 61-135591), un método para escindir un lado C-terminal de Arg en una secuencia de -Gly-Pro-Arg-con trombina (documento JP-A n.º 62-135500), un método para escindir un lado C-terminal de -Arg- con tripsina o clostripaína, un método para escindir un lado C-terminal de Arg o Lys con endoproteasa Arg-C (Nature, Vol. 285, págs. 456-461, 1980), un método para escindir un lado C-terminal de una secuencia de Lys-Arg, Arg-Arg o Pro-Arg con una proteasa Kex2 de *Saccharomyces cerevisiae* y un derivado de los mismos (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 144, pág. 807-814, 1987, documento JP-A n.º 1-199578, documento JP-A n.º 10-229884), un método para escindir un lado C-terminal de Lys con lisil endopeptidasa o endopeptidasa Lys-C (documento JP-A n.º 61-275222), un método para escindir un lado C-terminal de Asp o Glu con una proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 69, pág. 3506-3509, 1972), un método para escindir un lado C-terminal de una secuencia de -Phe-Arg- con caliceína (documento JP-A n.º 62-248489), un método para escindir entre Leu-Leu de una secuencia de -Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-(SEQ ID NO: 24) con renina (documento JP-A n.º 60-262595), un método para escindir un lado C-terminal de una secuencia -Glu-Gly-Arg- con urocinasa (documento JP-A n.º 2-100685), un método para escindir un lado C-terminal de una secuencia de Val-Asp-Asp- Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 25) con enteropeptidasa (Biotechnology, Vol. 6, pág. 1204-1210, 1988), un método para escindir un lado C-terminal de poli-Gly con lisostafina

(documento JP-A n.º 1-160496), y un método para escindir un lado C-terminal de Lys-Arg, Arg-Arg o Pro-Arg con *Kluyveromyces lactis* (documento JP-A n.º 1-124390).

Un vector de expresión, una célula huésped y la protección de un grupo funcional de cadena lateral del péptido deseado en el presente método son tal como se describieron para el método mencionado anteriormente.

- 5 Además, como método para producir un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido que ha experimentado modificación usando un método de recombinación genética o un método enzimático, puede usarse el método descrito en la publicación internacional n.º WO 99/38984.

10 Cuando un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido es un fragmento de péptido que no contiene aminoácido o no aminoácido que ha experimentado modificación de ghrelina o derivado de ghrelina (a continuación en el presente documento, denominado fragmento de ghrelina (componente no modificado)), un método para producir el fragmento mediante un método de recombinación genética y un método enzimático se describe en la publicación internacional n.º WO 01/07475.

15 Además, un fragmento de ghrelina (componente no modificado) también puede producirse usando un método enzimático de dos etapas con una proteasa OmpT o un derivado de la misma, así como una proteasa Kex2 o un derivado de la misma, adoptando una proteína protegida y una secuencia de ligador usada para producir péptido similar al glucagón tipo 1 descrito en la publicación internacional n.º WO 00/52193. En este método, puesto que puede utilizarse una proteasa OmpT endógena de *Escherichia coli* que es un huésped, no es necesario preparar una enzima por separado. El derivado de una proteasa OmpT o una proteasa Kex2 no está particularmente limitado siempre y cuando tenga la misma actividad que la de una proteasa OmpT o una proteasa Kex2. Los ejemplos de los derivados de la proteasa OmpT incluyen enzimas que pertenecen a una familia de ompTina, de las que son representativas una proteasa OmpP de *Escherichia coli*, y una proteasa pgtE de *Salmonella*, y péptidos parciales que contienen una parte activa de una proteasa OmpT. Los ejemplos del derivado de proteasa Kex2 incluyen los descritos en el documento JP-A n.º 10-229884, y las enzimas que pertenecen a una familia Kex2, de las que son representativas furina y PC1/3.

25 En el presente método, puede obtenerse de manera eficaz un fragmento de ghrelina (componente no modificado), entre otros, un fragmento de ghrelina (8-28), en particular, un fragmento de ghrelina humana (8-28) mediante un método de tratamiento enzimático de dos etapas usando una proteasa OmpT y una proteasa Kex2, mediante el uso, en lugar de una secuencia de ligador EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR (SEQ ID NO: 26) descrita en la publicación internacional n.º WO 00/52193, una secuencia  
30 EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR (SEQ ID NO: 27) en la que el residuo de prolina 35º está sustituido con un residuo de arginina en la secuencia mencionada anteriormente, como secuencia de ligador, tal como se muestra en el ejemplo 13. Aunque se produce por separado un sitio de reconocimiento de escisión además de un sitio de reconocimiento de escisión de una proteasa OmpT en la secuencia de ligador recién encontrada descrita en la SEQ ID NO: 27, la escisión se produce de manera precisa sólo en el sitio deseado (véase el ejemplo  
35 3).

Además, con la purificación y el almacenamiento de un fragmento de péptido protegido (componente no modificado), mediante el ajuste de un pH de una disolución usada para la purificación o el almacenamiento a de 4 a 8, puede prevenirse la eliminación de un grupo protector. Por tanto, suprimiendo la eliminación de un grupo protector, puede producirse una proteína o péptido modificado altamente puro con un alto rendimiento de recuperación. Como  
40 disolución usada para purificación o almacenamiento, es preferible una disolución acuosa. Los ejemplos de una disolución de este tipo incluyen agua, preferiblemente, agua de ultrafiltración y una disolución de acetato de sodio. Tal como resulta evidente a partir del ejemplo 15 en el que se examinó la estabilidad de un fragmento de ghrelina humana protegida (8-28) en una disolución acuosa, la estabilidad de un fragmento de péptido protegido con un grupo Boc es diferente dependiendo del estado de una disolución acuosa y, en particular, en el estado de una disolución acuosa a un pH de 2 o inferior, se reconoció una clara eliminación del presente grupo protector y, por tanto, cuando se usa un grupo Boc como grupo protector, es preferible fijar un pH de una disolución con purificación o almacenamiento de entre 4 y 8.

Entonces, en la presente invención, (a) el fragmento de péptido protegido obtenido anteriormente que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados y (b) el fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido  
50 o no aminoácido modificado se condensan, opcionalmente seguido por desprotección de un grupo protector para un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido.

Es preferible que la reacción de condensación anterior se realice mediante un método en fase líquida. Además, en la reacción para condensar fragmentos de péptido (a) y (b) mediante un método en fase líquida, habitualmente se protege un grupo funcional de cadena lateral de cada aminoácido o no aminoácido de los fragmentos de péptido con un grupo protector. Los ejemplos del grupo protector incluyen los facilitados anteriormente a modo de ejemplo como grupo protector para cada grupo funcional. Los ejemplos de grupo protector preferible incluyen grupos protectores de manera que un grupo protector para los fragmentos de péptido protegidos (a) y (b) pueda eliminarse en la misma condición de eliminación. En este caso, puesto que ya se ha escindido una resina escindible con ácido débil, no es necesario tener en cuenta las condiciones de escisión para una resina escindible con ácido débil. Como grupo  
55

protector para un grupo funcional de cadena lateral en este caso, es preferible un grupo protector que se elimina en condiciones de eliminación para un grupo amino N-terminal.

- 5 En la reacción para condensar los fragmentos de péptido protegidos (a) y (b) mediante un método en fase líquida, los reactivos y condiciones usados para la condensación se seleccionan de manera apropiada de los descritos en una reacción de condensación de aminoácidos tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, se seleccionan de métodos que apenas producen impurezas tales como isómeros racémicos de un péptido o una proteína como subproducto. En particular, los ejemplos preferibles de reactivo usado en condensación (agente de condensación) incluyen hexafluorofosfato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), difenilfosforilazida (DPPA), difenilfosforocianidato (DEPC), diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Entre otros, es preferible que un agente de condensación sea diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y la condensación de un fragmento de péptido usando el agente de condensación se realiza en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxisuccinimida (HOSu) o 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-benzotriazina (HOObt).
- 15 En el producto de reacción condensado, un grupo protector para una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido puede desprotegerse de manera apropiada. Los reactivos y condiciones para la desprotección en este caso se seleccionan preferiblemente de métodos que apenas producen impurezas tales como isómeros racémicos de un péptido o una proteína como subproducto.

20 Las condiciones para eliminar cada grupo protector pueden ser, por ejemplo, según el método conocido descrito en "Fundamental and Experiment of Peptide Synthesis" mencionado anteriormente. Como método para eliminar un grupo protector, hay métodos que utilizan, respectivamente, un ácido fuerte, un ácido débil, una base, un reactivo reductor (reducción catalítica, metal, tiol, etc.), un reactivo oxidante, un nucleófilo, un electrófilo, un ion, un electrón, luz, un disolvente y una enzima. La selección del grupo protector puede realizarse teniendo en cuenta las condiciones de eliminación de estos métodos de eliminación.

25 Como método para eliminar un grupo protector (reacción de desprotección), por ejemplo, se usan tratamiento con ácido trifluoroacético, ácido acético, fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, o una mezcla de los mismos (preferiblemente, ácido trifluoroacético, ácido acético, etc.); tratamiento con base con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina o piperazina; reducción catalítica bajo una corriente de hidrógeno en presencia de un catalizador tal como Pd-carbono; tratamiento con polvo de zinc en ácido acético (Zn/AcOH); y tratamiento con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF). La reacción de desprotección se realiza generalmente a una temperatura de aproximadamente 40°C o inferior, preferiblemente a aproximadamente 25°C o inferior, por lo que puede suprimirse eficazmente la reducción de isómeros racémicos de un fragmento de péptido protegido como subproducto. Un tiempo de reacción para la reacción de desprotección es habitualmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 horas.

35 En el tratamiento con ácido anterior, es preferible añadir un eliminador de cationes tal como agua, triisopropilsilano (TIPS), fenol, anisol, tioanisol, metacresol, paracresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditiol, y 1,2-etanoditiol (preferiblemente, fenol). Además, un grupo 2, 4-dinitrofenilo usado como grupo protector para imidazol de histidina se elimina mediante tratamiento con tiofenilo, y un grupo formilo usado como grupo protector de indol de triptófano se elimina mediante tratamiento con álcali con una disolución diluida de hidróxido de sodio o amoniaco diluido además de la desprotección mencionada anteriormente mediante tratamiento con ácido en presencia de 1,2-etanoditiol o 1,4-butanodiol.

45 El producto de reacción obtenido mediante la presente invención puede aislarse y purificarse mediante medios de separación y purificación convencionales tales como el método de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de partición, cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa y electroforesis. El producto que va a purificarse no se limita a una proteína o péptido modificado como producto final, sino que huelga decir que puede purificarse de manera apropiada un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, o un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, o el producto como producto intermedio en una etapa de producirlos mediante los medios de separación y purificación mencionados anteriormente.

50 Tal como se describió anteriormente, puede producirse una proteína o péptido modificado. El método de producción mencionado anteriormente de la presente invención puede aplicarse a cualquier proteína o péptido modificado sin ninguna limitación. Entre otros, el método de producción se usa de manera adecuada en la producción de ghrelina, preferiblemente ghrelina humana, de rata, de ratón, porcina, de pollo, de anguila, bovina, equina, ovina, de rana, de trucha o canina, o un derivado de ghrelina. Las estructuras de las ghrelinas mencionadas anteriormente de los organismos respectivos se describen en la tabla 1. La ghrelina o derivado de ghrelina obtenido mediante la presente invención es ghrelina o derivado de ghrelina de calidad extremadamente alta que tiene una cantidad considerablemente pequeña de impurezas (en particular, isómeros racémicos de ghrelina o derivado de ghrelina) en comparación con la ghrelina o el derivado de ghrelina obtenido mediante la técnica anterior. Como resultado, puede realizarse purificación suficiente de manera eficaz mediante un método de purificación más sencillo, puede acortarse el tiempo de trabajo y puede producirse ghrelina o derivado de ghrelina con un alto rendimiento. También con

respecto a esto, el método de producción de la presente invención es un método extremadamente ventajoso como método industrial para producir ghrelina o derivado de ghrelina.

Los ejemplos de "ghrelina o derivado de ghrelina de alta calidad" mencionado anteriormente incluyen ghrelina o derivado de ghrelina purificado o una sal del mismo que tiene un contenido en sustancias análogas totales de aproximadamente no más del 1% (preferiblemente de aproximadamente no más del 0,9%, más preferiblemente de no más del 0,8%, de manera adicional preferiblemente de aproximadamente no más del 0,7%). En el presente documento, sustancias análogas totales significa un total de todas las impurezas que se detectan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Los ejemplos de tales impurezas incluyen isómeros racémicos de ghrelina o derivado de ghrelina, sustancias análogas altamente polares y otras impurezas.

10 Una realización particularmente preferible de un método para producir una proteína o péptido modificado de la presente invención es tal como sigue: es decir, la realización es un método para producir una proteína o péptido modificado que comprende:

15 etapa 1; una etapa de producir, en una resina de eliminación débilmente ácida, un fragmento de péptido (a) que comprende una secuencia de al menos los aminoácidos 1° a 4° del extremo N-terminal, en la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NOS:1 a 21, preferiblemente comprende una secuencia de los aminoácidos 1° a 5° del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, o comprende una secuencia de los aminoácidos 1° a 7° del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, (b) en el que un grupo hidroxilo de una cadena lateral de serina o treonina que es el 3<sup>er</sup> aminoácido del extremo N-terminal está acilado, preferiblemente acilado con un grupo alquilo saturado o insaturado de un número de carbonos de 2 a 35, preferiblemente de 6 a 18, y (c) en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido y una reacción de condensación de fragmentos de péptido en la siguiente etapa (4), seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido, preferiblemente un grupo hidroxilo y un grupo amino están protegidos con un grupo protector,

etapa (2); una etapa de escindir el fragmento de péptido de una resina escindible con ácido débil en condiciones débilmente ácidas sin eliminación de un grupo protector en el fragmento de péptido,

30 etapa (3); una etapa de producir un fragmento de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos distinta de una secuencia de aminoácidos poseída por el fragmento de péptido producido en las etapas (1) y (2) en la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 21, preferiblemente una secuencia de los aminoácidos 6° a 28° del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, o una secuencia de los aminoácidos 8° a 28° del extremo N-terminal en dicha secuencia de aminoácidos, y en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la producción de un fragmento de péptido y una reacción de condensación de fragmentos de péptido en las siguientes etapas (4), seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, preferiblemente un grupo hidroxilo y un grupo amino están protegidos por un grupo protector, y

40 etapa (4); una etapa de condensar el fragmento de péptido producido en la etapa (2) y el fragmento de péptido producido en la etapa (3), opcionalmente seguido por la desprotección de un grupo protector para un grupo funcional reactivo.

Una proteína o péptido modificado obtenido mediante el método de la presente invención se produce en forma de un péptido libre o una sal del mismo dependiendo de las condiciones de reacción. Un péptido libre y su sal son intercambiables mediante el método convencional. Cuando un péptido libre se convierte en una sal farmacológicamente aceptable, por ejemplo, el péptido puede hacerse reaccionar con el siguiente ácido inorgánico o ácido orgánico facilitados a modo de ejemplo. Como sal del péptido o la proteína, es preferible una sal farmacológicamente aceptable. Los ejemplos de una sal de este tipo, cuando el péptido o la proteína tiene un grupo básico tal como un grupo amino, incluyen sales con ácidos inorgánicos (también denominados ácidos inorgánicos libres) (por ejemplo ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, etc.) o ácidos orgánicos (también denominados ácidos orgánicos libres) (por ejemplo ácido succínico, ácido acético, ácido propiónico, ácido trifluoroacético, etc.). Cuando el péptido o la proteína tiene un grupo ácido tal como un grupo carboxilo, hay sales facilitadas a modo de ejemplo con bases inorgánicas (también denominadas bases inorgánicas libres) (por ejemplo metales alcalinos tales como sodio, potasio, etc., metales alcalinotérreos tales como calcio, magnesio, etc.) o bases orgánicas (también denominadas bases orgánicas libres) (por ejemplo aminas orgánicas tales como trietilamina, etc., aminoácidos básicos tales como arginina, etc.). Alternativamente, el péptido o la proteína pueden formar un compuesto complejo de metal (por ejemplo complejo de cobre, complejo de zinc, etc.).

Una proteína o péptido modificado producido mediante el método de la presente invención puede utilizarse para diversos usos. Por ejemplo, la ghrelina o derivado de ghrelina purificado mencionado anteriormente es poco tóxico, y puede administrarse a un mamífero (por ejemplo un ser humano, mono, perro, rata, ratón) como medicamento para tratar trastornos de la alimentación, un agente para promover la secreción de hormonas de crecimiento, un remedio

5 para enfermedad cardiaca, un remedio para enfermedad funcional del estómago, un agente para proteger una mucosa del tracto intestinal o un agente para prevenir un trastorno de la mucosa del intestino delgado en la nutrición por vía venosa, un remedio para la osteoporosis, un agente para reducir la caquexia debida a enfermedad crónica y un remedio para la disfunción pulmonar. La ghrelina o derivado de ghrelina purificado mencionado anteriormente puede administrarse por vía oral como un comprimido, una cápsula, un elixir o una preparación de liberación sostenida que se recubre con un recubrimiento de azúcar según sea necesario, o puede administrarse por vía parenteral en forma de una inyección tal como una disolución estéril, una suspensión y una preparación de liberación sostenida con agua u otra disolución farmacéuticamente aceptable; una preparación nasal tal como una disolución y una suspensión; una preparación pulmonar tal como un aerosol y una inhalación; un supositorio. La preparación mencionada anteriormente puede producirse mezclando la ghrelina o derivado de ghrelina purificado con el portador, aroma, excipiente vehículo, antiséptico, estabilizador, aglutinante y similares fisiológicamente aprobados en una dosificación unitaria requerida para la farmacia generalmente aprobada.

### Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención en detalle, pero la presente invención no se limita a los mismos. Como método de prueba e instrumento usados en los presentes ejemplos, se usaron los descritos a continuación a menos que se indique otra cosa.

(Principales abreviaturas)

HBTU; hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio

DCC; diciclohexilcarbodiimida,

20 HOBt; 1-hidroxibenzotriazol

HOObt; 3-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina

TFA; ácido trifluoroacético

TIPS; triisopropilsilano

DIPEA; diisopropiletilamina

25 TBAF; fluoruro de tetrabutilamonio

TFE; trifluoroetanol

Fmoc; fluorenilmetoxicarbonilo

Boc; t-butiloxicarbonilo

tBu; t-butilo

30 TBDMS; t-butildimetilsililo

Trt; tritilo

Pac; fenacilo

DMF; N,N-dimetilformamida

DCM; diclorometano

35 NMP; N-metilpirrolidona

Et<sub>2</sub>O; dietil éter

DMAP; 4-dimetilaminopiridina

EDC; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

(Aminoácidos protegidos y resinas usados para síntesis)

40 Boc-Gly, Fmoc-Ser(TBDMS), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Leu, Fmoc-Ser, Fmoc-Pro (todos fabricados por Watanabe Kagaku Kogyo o Applied Biosystem), resina de prolil-2-clorotritilo (Novabiochem).

(Instrumentos usados)

(a) Sintetizador automático de péptidos

- Sintetizador 433A fabricado por Applied Biosystem
- (b) Sistema de HPLC analítica
- Instrumento: Sistema Shimadzu LC-10A
- 5 Columna: YMC-Pack PROTEIN-RP o YMC-Pack ODS AP-302 o YMC-Pack PROTEIN-C8 (todos ellos de 4,6 mmφ x 150 mm)
- Temperatura de la columna: 40°C
- Eluyente: En ácido trifluoroacético al 0,1%, la concentración de acetonitrilo se cambió linealmente hasta un máximo del 100%.
- Velocidad de flujo: 1 ml/min.
- 10 Detección: UV (210 nm o 214 nm)
- Cantidad de inyección: de 10 a 50 µl
- (c) Sistema de cromatografía preparativa
- Instrumento 1: AKTA explorer 10S (sistema de cromatografía fabricado por Amersham Pharmacia Biotech)
- Columna: Perlas grandes de SP-sepharose (XK26/30) (resina fabricada por Amersham Pharmacia Biotech)
- 15 Diámetro interno 26 mm x longitud 300 mm
- YMC-ODS 120 s50 (HR26/15) (resina fabricada por YMC)
- Diámetro interno 26 mm x longitud 15 mm
- Vydac C4 (HR10/30) (Vydac)
- Diámetro interno 10 mm x longitud 300 mm
- 20 Fuente 30RPC (HR10/30) 23 ml (resina fabricada por Amersham Pharmacia Biotech)
- Diámetro interno 10 mm x longitud 30 mm
- Las condiciones de velocidad de flujo, eluyente y similares se describen por separado en los ejemplos.
- Instrumento 2: Estación de trabajo de cromatografía de perfusión BioCAD de Applied Biosystem
- Columna: SP-Toyopearl 550-c (diámetro interno 16 mm x 280 mm fabricada por TOSOH)
- 25 YMC-ODS AM (Diámetro de partícula 20 µm, diámetro interno 21,5 mm x 300 mm fabricada por YMC)
- Columna de cromatografía en fase inversa ODS-80Ts (columna de diámetro interno 21,5 mm x 300 mm (108 ml) diámetro de partícula 20 µm, fabricada por TOSOH)
- Las condiciones de velocidad de flujo, eluyente y similares se muestran en los ejemplos por separado.
- (d) Sistema de HPLC preparativa
- 30 Instrumento: Waters 600 Multisolvent Delivery System
- Columna: YMC-Pack ODS-A (5 µm, 20 mm x 250 mm) o YMC-Pack PROTEIN-RP (5 µm, C4, 20 mm x 250 mm)
- Eluyente: En ácido trifluoroacético al 0,1%, la concentración de acetonitrilo se cambió linealmente de manera apropiada hasta un máximo del 100%.
- Velocidad de flujo: 10 ml/min.
- 35 Detección: 210 nm y 260 nm
- Inyección: se inyectaron de 10 a 2000 µl, 2000 µl o más con una bomba.
- (e) Espectrómetro de masas
- Instrumento 1: Finnigan MAT Corporation TSQ700

Fuente de iones: ESI

Modo iónico de detección: positivo

Tensión de pulverización: 4,5 kV

Temperatura de capilar: 250°C

5 Fase móvil: disolución mixta de ácido acético-metanol al 0,2% (1:1)

Velocidad de flujo: 0,2 ml/min.

Intervalo de barrido: m/z de 300 a 1,500

Instrumento 2: API3000 (TAKARA SHUZO Co., Ltd.)

Modo iónico de detección: modo positivo

10 Tipo de barrido: Barrido Q1

Velocidad de flujo: 0,3 ml/min.

1 cuenta/0,1 ms durante un seguimiento de 5 min.

Intervalo molecular de 500 a 3000 de masa

(f) Análisis de la secuencia de aminoácidos:

15 Instrumento: Secuenciador tipo 477A de Applied Biosystem fabricado por Perkin Elmer

(g) Análisis de la composición de aminoácidos

Instrumento: Instrumento de análisis de aminoácidos tipo L-8500 fabricado por Hitachi, Ltd.

Muestra: En un tubo sellado, se hidrolizó la muestra con ácido clorhídrico 6 M que contiene fenol al 0,1% a 110°C durante 24 horas. [Escala para producir [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)] ghrelina derivada de ser humano (8-28) y resumen]

20 A continuación en el presente documento, el ejemplo 2 al ejemplo 8 son resultados de cultivo y purificación para el fin de obtener aproximadamente 0,6 g de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) (indica ghrelina derivada de ser humano). A continuación en el presente documento, lo mismo como producto purificado final. El vector de expresión mostrado en el ejemplo 1 se transformó en *Escherichia coli*, para expresar una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el propio ejemplo. Se realizó la fermentación mediante cultivo de alta densidad usando un fermentador de 2 l y se recuperaron los cuerpos de inclusión. Se usó la mitad de la cantidad de los cuerpos de inclusión recuperados para iniciar la purificación. Se utilizaron de una vez una reacción con OmpT (escala de 0,9 l), perlas grandes de SP-sepharose de intercambio catiónico (escala de 160 ml), una reacción de butoxicarbonilación (escala de 0,5 l), una columna en fase inversa YMC ODS-120 s50 (escala de 80 ml) y una reacción de Kex2 (escala de 0,3 l), respectivamente. Se utilizó la columna en fase inversa Vydac C4 (escala de 25 ml) como purificación final dos veces. En una etapa de purificación final, se realizó el análisis fraccional mediante la elución con un gradiente de concentración lineal. Además, se usó un evaporador para desolvatación y se usó un filtro de fibra de vidrio (Whatman plc) para filtración a presión reducida.

Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión p117 8-28oRR derivado de h-grelina (8-28)

35 Basándose en una secuencia génica de ADNc de h-grelina (Kojima *et al.*, Nature, vol. 402, págs. 656-660, 1999), se obtuvo un fragmento de ADN de h-grelina (8-28) usando un oligo-ADN sintético total (Pharmacia Biotech) mediante un método de hibridación. En la figura 1A se muestran un oligo-ADN sintético total y una secuencia de aminoácidos usados para hibridar.

40 Con el fin de insertar este fragmento de ADN en un plásmido pGP117ompPR en el que se había introducido un gen de una proteína de fusión de derivado de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* y péptido similar al glucagón-1 humano (publicación internacional n.º WO 00/52193), se trató pGP117ompPR con las enzimas de restricción Sall y SacII, y se sometió a electroforesis en gel de agar para preparar un fragmento de ADN que carece de un gen del péptido similar al glucagón-1 humano. Tras el tratamiento adicional con fosfatasa alcalina, esto se ligó con un fragmento génico de derivado de h-grelina (8-28) que se había sometido a tratamiento con SacII y tratamiento con ADN cinasa de T4, con ADN ligasa de T4. Se transformó el plásmido ligado en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para obtener un plásmido p117 8-28oPR. El plásmido expresa una proteína de fusión en la que una secuencia de aminoácidos de h-grelina (8-28) y un fragmento parcial (117 residuos de aminoácido) de  $\beta$ -galactosidasa se ligan con una secuencia de ligador que tiene una secuencia de aminoácidos de EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR (SEQ ID NO: 26).

Además, se realizó PCR mediante el uso de este plásmido p117 8-28oPR como molde, KODplus polimerasa (Toyobo Co., Ltd.) como enzima, y los dos tipos siguientes de cebadores:

ORI-RR: GGTTCCGGATCCCCTTCTCGACATCGCCGGGAACAC (SEQ ID NO: 28)

SAL\*R: ATAAGTCGACTTATCGTGGCTGCAG (SEQ ID NO: 29)

- 5 como cebador y se escindió el fragmento amplificado del gel sometido a electroforesis. Además, esto se trató con las enzimas de restricción Sall y BamHI. El p117 8-28oPR que se había tratado previamente con las enzimas de restricción Sall y BamHI de manera similar, se purificó y estos fragmentos se ligaron con una ADN ligasa de T4 y el plásmido ligado se transformó en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para obtener un plásmido p117 8-28oRR. El plásmido expresa una proteína de fusión en la que se ligan una secuencia de aminoácidos de h-grelina (8-28) y un fragmento parcial de  $\beta$ -galactosidasa (117 residuos de aminoácido) con una secuencia de ligador que tiene una secuencia de aminoácidos de EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR (SEQ ID NO: 27). La proteína de fusión expresada se muestra en la figura 1B más adelante.

Ejemplo 2: Expresión de proteína de fusión de h-grelina (8-28) recombinante en *Escherichia coli* y recuperación de cuerpos de inclusión

- 15 Se transformó el plásmido p117 8-28oRR obtenido en el ejemplo 1 en la cepa W3110 de *Escherichia coli*, y se usó la *Escherichia coli* transformada para realizar un cultivo en un medio de 2 l en un fermentador de 3 l. Este plásmido de expresión es un plásmido derivado de pBR322, y la expresión del mismo se induce con un promotor lac. Además, el plásmido conserva un gen resistente a tetraciclina como gen de resistencia a fármacos. Se llevó a cabo el precultivo en un caldo LB mediante agitación a 32°C durante 14 horas. En el presente cultivo, se usó un medio que tiene la siguiente composición. La composición del medio es extracto de levadura 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 0,2 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 g/l, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 40 mg/l, FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 40 mg/l, MnSO<sub>4</sub>•NH<sub>2</sub>O 10 mg/l, AlCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O 10 mg/l, CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 4 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2 mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 2 mg/l, CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 2 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,5 mg/l. Se añadió inicialmente glucosa como fuente de carbono a un medio al 1% para iniciar el cultivo a 37°C. Una vez agotada la glucosa, se añadió glicerol como fuente de carbono para continuar el cultivo. Después, se sometió la disolución de cultivo a una máquina de ruptura de células por presión (Mantongorin) para romper las células y se recuperaron aproximadamente 80 g de cuerpos de inclusión mediante una centrifuga. Además, estos cuerpos de inclusión se resuspendieron en 2 l de agua desionizada y se recuperaron con una centrifuga para lavar los cuerpos de inclusión. Finalmente, se obtuvieron 200 ml de una suspensión de los cuerpos de inclusión que tenía un valor de DO<sub>660</sub> de 530.

- 30 Los siguientes ejemplos se realizaron usando 100 ml (la mitad de la cantidad) de esta suspensión de cuerpos de inclusión.

Ejemplo 3: Procesamiento de proteína de fusión de h-grelina (8-28) con proteasa endógena OmpT

- 35 Se diluyó la suspensión de cuerpos de inclusión obtenida en el ejemplo 2 con aditivos y agua desionizada en las siguientes condiciones de reacción mostradas de modo que el valor de DO<sub>660</sub> llegara a ser de 100,0, y se realizó una reacción con OmpT en las siguientes condiciones de reacción.

Condiciones de reacción:

Urea 4 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, volumen de reacción: 800 ml, temperatura de reacción 32°C, tiempo de reacción 40 minutos

- 40 Se disolvieron los cuerpos de inclusión y se diluyeron con 400 ml de urea 8 M hasta 100 DO<sub>660</sub>/ml, se añadieron Tris-HCl y NaCl a la disolución y se mezcló con agua desionizada hasta 800 ml. Además, se ajustó el pH a 7,4 para iniciar una reacción. A los 0 minutos, 20 minutos y 40 minutos desde el inicio de la reacción, se realizó la toma de muestras, se realizó el análisis mediante HPLC y se detuvo la reacción a los 40 minutos, a los que la tasa de escisión superó el 80%. Se detuvo la reacción aumentando el pH hasta 11 con NaOH 5 N. Una vez detenida la reacción, se eliminó el residuo mediante centrifugación a baja velocidad para obtener el sobrenadante.

- 45 Concentración de (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28): 2,23 mg/ ml

Cantidad de disolución; 800 ml

Contenido en péptido; 1,7 g

- 50 Como resultado de la medición de HPLC y espectrometría de masas, se demostró que el procesamiento se produce de manera precisa y se libera (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28). Un valor de EM-ESI medido con un espectrómetro de masas (TSQ-700) de Finnigan MAT Corporation fue 4078 (valor teórico; 4077).

Ejemplo 4: Purificación de (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) (purificación mediante intercambio catiónico)

Se purificó el sobrenadante de la disolución de la reacción de la proteasa OmpT obtenida en el ejemplo 3 mediante

cromatografía catiónica.

Método:

Columna usada; perlas grandes de SP-sepharose (XK26/30)(160 ml) (resina fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) Diámetro interno 26 mm x longitud 300 mm

5 Disolución de equilibración y lavado: urea 1,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 11

Eluyente: urea 1,5 M, NaCl 0,5 M, NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 11

Disolución de inicio, regeneración; NaOH 0,4 M

Velocidad de flujo: 10 ml/min. (2,5 cm/min.)

Manipulación:

10 Inicio, equilibración: 2 volúmenes de columna de NaOH 0,4 M → 2 volúmenes de columna de agua desionizada → disolución de equilibración: 3 volúmenes de columna al 100%

Carga de la muestra: Se carga la muestra y se lava con una disolución de equilibración y lavado hasta que se reduce UV (aproximadamente 4 volúmenes de columna).

Elución: Realizada mediante una elución gradual con el 100% de una disolución de elución.

15 Resultados: La pureza del péptido obtenido a partir de la disolución de elución fue del 90%, y el rendimiento de recuperación de la etapa fue del 91,6%.

Concentración de (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28): 4,75 mg/ml

Cantidad de disolución: 300 ml

Contenido en péptido: 1,43 g

20 Ejemplo 5: terc-Butoxicarbonilación de (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28)

La (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) purificada se somete a una reacción de adición de un grupo Boc, para proteger un grupo α-amino en el extremo N-terminal y un grupo amino de una cadena lateral de un residuo de Lys contenido en una secuencia.

25 Método: Se transfirió una cantidad total de 300 ml de eluyente de cromatografía catiónica a un vaso de precipitados de vidrio y se añadió un equivalente (300 ml) de acetonitrilo a acetonitrilo al 50%. Además, se añadió 1 M de (Boc)<sub>2</sub>O a 8,8 ml (concentración final 20 mM, 25 equivalentes) correspondiente a una cantidad en moles de 5 veces del número (total 5) de grupos α-amino presentes en (RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) y grupos ε-amino de una cadena lateral de residuos lisina, mientras se agitaba. Además, se ajustó el pH con NaOH 5 N de modo que el pH no se redujera a 9 o inferior y se realizó la reacción a temperatura ambiente durante 60 minutos mientras se agitaba con un agitador. Se monitorizó la medición de la eficacia de reacción mediante el análisis de HPLC y la medición del peso molecular.

30 Inmediatamente tras la finalización de la reacción, se realizó la desolvatación mediante un evaporador. Tras la desolvatación, se ajustó el pH a 5,5 con ácido acético y se filtraron los precipitados con un filtro de fibra de vidrio (Whatman plc) a presión reducida. Esta etapa proporcionó 580 ml de una disolución que contiene 1740 mg de [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28).

35 Tasa de recuperación de la etapa: 116% (El motivo por el que la tasa de recuperación de la etapa es mayor del 100% se considera de la siguiente forma: Se aumenta la absorción en HPLC mediante la adición de un grupo Boc y se aumenta la tasa de recuperación aparente).

40 Se realizó espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas (TSQ-700) de Finnigan MAT Corporation. El valor medido de EM-ESI fue 4578 (valor teórico; 4577).

45 Tras la reacción, el peso molecular aumentó (peso molecular medido = 4578, peso molecular teórico = 4577) en muchos casos en comparación con la t-butoxicarbonilación anterior (peso molecular medido = 4077, peso molecular teórico = 4077). Se supuso que esto era [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) en la que cuatro grupos ε-amino presentes en una cadena lateral de residuo de lisina en una secuencia de h-grelina (8-28) y un grupo α-amino del lado N-terminal se habían sometido a t-butoxicarbonilación.

Ejemplo 6: Purificación de [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) mediante cromatografía en columna en fase inversa

Se purificó la [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) obtenida en el ejemplo 5 mediante una columna en fase inversa.

Método:

5 Columna usada: YMC-ODS 120 s50 (HR26/15) 80 ml (resina fabricada por YMC). Diámetro interno 26 mm x longitud 15 mm.

Disolución de equilibración y lavado: acetonitrilo al 10%, acetato de sodio 30 mM pH 5,5.

Eluyente: acetonitrilo al 50%, acetato de sodio 30 mM pH 5,5

Disolución de regeneración: acetonitrilo al 80%

Velocidad de flujo: 7 ml/min. (2 cm/min.)

10 Tras la equilibración con 3 volúmenes de columna de una disolución de equilibración, se cargó una muestra y se lavó la columna con 3 volúmenes de columna de una disolución de equilibración (hasta que se redujo UV). Se realizó la elución mediante una elución gradual con el 100% de un eluyente. Tras la elución, se lavó la columna con una disolución de regeneración.

15 Se obtuvo un eluyente como 150 ml de una disolución que contiene 1770 mg de [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28). A esto se añadieron 75 ml de agua de ultrafiltración para diluir 1,5 veces y se eliminó por destilación el acetonitrilo contenido en la disolución con un evaporador.

Tasa de recuperación de la etapa: 98%

Ejemplo 7: Producción de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-h-grelina (8-28) con proteasa Kex2

20 Se ajustó la disolución de péptido obtenida en el ejemplo 6 a las siguientes condiciones para realizar una reacción con Kex2. Es decir, se diluyó un eluyente de ODS con un agua de ultrafiltración hasta 8 mg/ml y se añadió Tris-HCl 1 M de pH 8,3 hasta 50 mM. Además, se añadió CaCl<sub>2</sub> 0,25 M hasta 5 mM, esto se preincubó a 30°C durante 10 minutos y se añadió disolución de proteasa Kex2 (documento JPA n.º 10-229884) (1x10<sup>7</sup> unidades/ml) hasta 2,5x10<sup>4</sup> unidades, seguido por reacción en un tanque a temperatura constante a 30°C durante 120 minutos mientras se agitaba con un agitador. Tras la reacción, se ajustó el pH a 5,5 usando ácido acético para detener la reacción. A partir de HPLC, espectrometría de masas y análisis de aminoácidos, se encontró que [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)-h-grelina (8-28) que es un material de partida desaparecía tras la escisión de Kex2, y que [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) aparecía y, por tanto, se produce el procesamiento preciso.

25 Ejemplo 8: Purificación de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28)

30 Se purificó la disolución que contiene [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) obtenida en el ejemplo 7 tras la reacción con una columna en fase inversa en las siguientes condiciones:

Método:

Columna en fase inversa usada: Columna de 23 ml Vydac C4 (HR10/30) (Vydac)

Diámetro interno: 10 mm x longitud 300 mm

Condiciones:

35 Disolución de equilibración y lavado: acetonitrilo al 10%, TFA al 0,1%, pH 3

Eluyente: acetonitrilo al 50%, TFA al 0,1% pH 3

Velocidad de flujo: 2 ml/min. (velocidad de flujo lineal 3 cm/min.)

40 Se realizó la elución mediante un programa en el que se utilizaron 3 volúmenes de columna de una disolución de equilibración, se cargó la disolución tras la reacción de Kex2 en dos porciones (resina 20 mg/ml), se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de un eluyente al 10% y se completó un gradiente lineal del 10% al 80% de un eluyente en 8 volúmenes de columna. Posteriormente, se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de un eluyente al 100%, durante lo cual se recogieron fracciones de 6 ml de los eluyentes. Se analizaron las fracciones mediante HPLC y se reunieron las fracciones que no contenían un ligador [N<sup>α</sup>-Boc]-(RHHGSGSPSRHRR) y [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR) h-grelina (8-28) no escindida.

45 Resultados:

Rendimiento: 84,4%, pureza 97,5%

Concentración de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28): 5,62 mg/ ml

Cantidad de disolución: 120 ml

Contenido en péptido: 600 mg

- 5 Se desolvató la disolución eluida con un evaporador, seguido por liofilización hasta obtener 600 mg de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) a partir de 1700 mg de un precursor (ejemplo 3) obtenido mediante el procesamiento de un derivado de proteasa OmpT (figura 2).

Ejemplo 9: Tabla de tasa de recuperación de purificación y pureza de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28)

A continuación se facilita una lista del rendimiento de producción de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) mostrada en el ejemplo 3 al ejemplo 7 (tabla 2).

- 10 Tabla 2. Lista de rendimiento de producción de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) mostrada en el ejemplo 3 al ejemplo 8

Etapa	Pre 8-28 *	Boc-Pre8-28 **	Boc-8-28 ***	Cantidad de disolución (l)	Cantidad de Boc-8-28 *** (g)	Rendimiento de la etapa unitaria (%)	Rendimiento (%)	Pureza(%)
Reacción de Omp-T	2,23	2,51	1,68	0,8	1,3	-	100,0	
Tras centrifugación	1,97	2,21	1,48	0,8	1,2	91,6	91,6	90
Tras cromatografía catiónica	4,75	5,33	3,58	0,3	1,1	87,1	79,8	95
Tras t-butoxi-carbonilación	-	3,11	2,08	0,6	1,3	116,6	93,0	92
Tras concentración en fase inversa (YMC)	-	12,59	8,44	0,2	1,4	98,0	91,2	95
Tras reacción con Kex2	-	-	2,45	0,2	0,8	55,2	50,6	
Tras concentración en fase inversa (Vydac)	-	-	5,62	0,12	0,6	84,4	42,1	98

Pre 8-28\* significa (RHHGSGSPSRHRR)h-grelina (8-28)

Boc-Pre8-28\*\* significa [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)h-grelina (8-28).

Boc-8-28\*\*\* significa [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

- 15 Ejemplo10

(10-1) Síntesis del fragmento lateral N-terminal [[N<sup>α</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu)]h-grelina (1-7)) (Método 1)

- 20 Se colocó una resina de prolil-2-clorotritilo (1,39 g, 1,0 mmol, fabricada por Novabiochem) en un reactor equipado con un filtro de vidrio y se repitieron sucesivamente la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU y la eliminación de Fmoc con piperidina para introducir Boc-Gly en un residuo N-terminal, para construir una resina de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser (tBu)-Pro-2-clorotritilo. Se trató la resina con péptido protegido resultante con una disolución TBAF/DMF 0,1 M (50 ml) durante 30 minutos. Se filtró la resina con péptido, se lavó con DMF (30 ml) algunas veces y se lavó con alcohol isopropílico y DCM (30 ml). Entonces, se hinchó la resina con péptido de-

TBDMS resultante con NMP (5 ml) y se añadieron ácido octanoico (588 mg, 4,1 mmol) y EDC.HCl (848 mg, 4,4 mmol) en presencia de DMAP (374 mg, 3,1 mmol) para que reaccionaran durante 16 horas. Se filtró la resina, se lavó sucesivamente con NMP, alcohol isopropílico y DCM, y se secó a presión reducida para obtener una resina con péptido protegido en la que una cadena lateral de serina en la posición 3 se había sometido a octanoilación. A esto se añadieron 30 ml de una disolución de TFA/DCM al 0,5% y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos para escindir el péptido protegido de la resina. Se filtró la resina, se concentró el filtrado y se añadió agua al residuo para obtener precipitados. Se filtraron los precipitados, se lavaron mediante agitación en hexano y se filtraron de nuevo. Esto se secó durante la noche a presión reducida para obtener 742 mg del producto deseado (rendimiento 72%). Se investigó la pureza de este producto mediante HPLC y se encontró que era del 94%.

#### 10 (10-2) Síntesis del fragmento lateral N-terminal ( $[N^{\alpha}\text{-Boc, Ser}^{2,6}(\text{tBu})]\text{h-grelina (1-7)}$ ) (Método 2)

Se colocó una resina de prolil-2-clorotritilo (1,95 g, 1,0 mmol, fabricada por Novabiochem) en un reactor equipado con un filtro de vidrio y se repitieron sucesivamente la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU y la eliminación de Fmoc con piperidina para construir una resina de Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-clorotritilo. Entonces, se introdujo Fmoc-Ser-OH con HOObt/DCC y de-Fmoc y se repitió la condensación con HOObt/DCC para introducir Boc-Gly en un residuo N-terminal, para construir una resina de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-clorotritilo. Se hinchó la resina con péptido resultante con NMP (5 ml) y se añadieron ácido octanoico (579 mg, 4,0 mmol) y EDC.HCl (847 mg, 4,4 mmol) en presencia de DMAP (374 mg, 3,1 mmol) para que reaccionaran durante 16 horas. Se filtró la resina, se lavó sucesivamente con NMP, alcohol isopropílico y DCM, y se secó a presión reducida para obtener una resina con péptido protegido en la que una cadena lateral de serina en la posición 3 se había sometido a octanoilación. A esto se añadieron 30 ml de una disolución de TFA/DCM al 0,5% y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos para escindir el péptido protegido de la resina. Se filtró la resina, se concentró el filtrado y se añadió agua al residuo para obtener precipitados. Se filtraron los precipitados, se lavaron mediante agitación en hexano y se filtraron de nuevo. Esto se secó durante la noche a presión reducida para obtener 715 mg del producto deseado (rendimiento 69%). Se investigó la pureza de este producto mediante HPLC y se encontró que era del 74%.

#### Ejemplo 11: Condensación y desprotección de fragmentos

Se cuantificaron  $[N^{\alpha}\text{-Boc, Ser}(\text{tBu})^{2,6}]\text{h-grelina (1-7)}$  y  $[\text{Lys}^{16,19,20,24}(\text{Boc})]\text{h-grelina (8-28)}$  obtenidos en el ejemplo 10-1 y en el ejemplo 8 de antemano usando un analizador de aminoácidos y se sometieron a una reacción de condensación. Se disolvieron cada 0,19 mmol de  $[N^{\alpha}\text{-Boc, Ser}(\text{tBu})^{2,6}]\text{h-grelina (1-7)}$ , HBTU y DIPEA en 1 ml de DMF, y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se disolvieron 0,16 mmol de  $[\text{Lys}^{16,19,20,24}(\text{Boc})]\text{h-grelina (8-28)}$  y 0,48 mmol de DIPEA en 1,5 ml de DMF y se añadió gota a gota la disolución de fragmento lateral N-terminal activada mencionada anteriormente mientras se agitaba. Tras 1 hora, se eliminó mediante filtración el disolvente de la reacción a presión reducida y se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  al residuo para obtener precipitados, que se lavaron y se secaron. A los polvos resultantes se añadieron 6 ml de TFA y se agitó lentamente la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó por destilación TFA a presión reducida y se añadió  $\text{Et}_2\text{O}$  al residuo para obtener precipitados, que se lavaron y se secaron para obtener 0,70 g del péptido en bruto en polvo blanco. Esto se analizó mediante HPLC analítica y, como resultado, la pureza del producto deseado en un gráfico fue del 80% y el tiempo de retención fue coherente con el de un producto obtenido completamente mediante síntesis química. Además, el producto semi-sintético y el producto obtenido completamente mediante síntesis química se coinjectaron y los picos en el cromatograma fueron coherentes. Los gráficos de HPLC antes y después de la condensación se muestran en la figura 3.

#### Ejemplo 12: Purificación de h-grelina

Se disolvieron 0,70 g del péptido en bruto en polvo blanco obtenido en el ejemplo 11 en 7 mg/ml de ácido acético al 5%, seguido por purificación en las siguientes condiciones;

#### 45 Método, condiciones;

Columna usada: Columna de 23 ml Source 30RPC (HR10/30) (resina fabricada por Amersham Pharmacia Biotech) Diámetro interno 10 mm x longitud 30 mm

Disolución de equilibración y lavado: acetonitrilo al 10%, ácido acético 50 mM

Eluyente: acetonitrilo al 60%, ácido acético 50 mM

#### 50 Disolución de regeneración: acetonitrilo al 80%

Velocidad de flujo: 2,5 ml/min. (2 cm/min.)

Tras la equilibración con 3 volúmenes de columna de una disolución de equilibración, se dividió la disolución disuelta de h-grelina en dos mitades, se cargó cada mitad y se lavó la columna con 3 volúmenes de columna de una disolución de equilibración (hasta que se redujo UV). Se realizó la elución mediante un programa mediante el cual se completó un gradiente lineal del 0% al 100% de un eluyente en 6 volúmenes de columna. Se fraccionó cada fracción

de eluyentes de 5 ml, se analizó mediante HPLC en un momento apropiado y se reunieron las fracciones que contenían h-grelina. Se desolvató el conjunto con un evaporador, seguido por liofilización. Como resultado, se obtuvieron 512 mg de h-grelina que tenía una pureza del 98% (tasa de recuperación 73%). En la figura 4 se muestran los resultados del análisis de HPLC de h-grelina purificada.

- 5 Los siguientes ejemplos 13 a 15 se refieren a la optimización de las condiciones mostradas en los ejemplos 1 a 12 mencionados anteriormente. Por tanto, huelga decir que la presente invención no se limita a las siguientes condiciones.

Ejemplo 13: Diferencia en la eficacia de escisión de Kex2 debido a la diferencia en las secuencias de proteínas de fusión

- 10 La eficacia de escisión de Kex2 es enormemente diferente dependiendo de la secuencia de reconocimiento de un sustrato de la misma. Se ha notificado que la eficacia de escisión se hace más pequeña *in vivo* en el orden de una secuencia de escisión de Kex2 KR(10)>>RR(5)>>TR(1,2)>PR(1,0) (El valor entre paréntesis es la eficacia de escisión cuando la de PR es 1) (Proc. Natl. Acad. Sci 95 págs. 10384-10389 1998).

- 15 La siguiente figura 5 muestra proteínas expresadas por p117s 8-28oPR y p117 8-28oRR obtenidos en el ejemplo 1, y un plásmido p117 8-28oKR obtenido mediante PCR usando p117 8-28oPR como molde.

- Se cultivó la cepa W3110 de *Escherichia coli* que porta un plásmido que expresa cada uno de estos tres tipos de proteínas y se realizó la purificación a una escala de aproximadamente 1/10 de la de los métodos mostrados en los ejemplos 2 a 6, para preparar así tres tipos de péptidos de [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHPR)h-grelina (8-28) (a continuación en el presente documento, PR-h-grelina (8-28)), [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)h-grelina (8-28) (a continuación en el presente documento, RR-h-grelina (8-28)) y [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHKR)h-grelina (8-28) (a continuación en el presente documento, KR-h-grelina (8-28)), respectivamente.
- 20

Los péptidos preparados se sometieron a tratamiento con proteasa Kex2 usando el método mostrado en el ejemplo 7. En la figura 6 se muestra un perfil analítico de HPLC a los 60 minutos tras el inicio de la reacción.

- 25 Tal como se muestra en la figura 6, el orden de la tasa de escisión es RR-h-grelina (8-28)>PR-h-grelina (8-28)>KR-h-grelina (8-28) y RR-h-grelina (8-28) fue superior en la tasa de escisión. En KR-h-grelina (8-28), puesto que un grupo Boc protege al residuo de lisina de KR y se pierde una carga de lisina, no se producirá la escisión en absoluto. Además, PR-h-grelina (8-28) tuvo una eficacia de escisión baja y se produjo otra escisión en h-grelina (8-28). En la degradación en esta h-grelina (8-28), se produjo la escisión entre la arginina de un aminoácido número 15 de h-grelina y la lisina de un aminoácido número 16.
- 30

Ejemplo 14: Construcción de proteína de fusión adecuada para cultivar *Escherichia coli*

- Con el fin de obtener una proteína de fusión adecuada para el cultivo, se obtuvo un plásmido que expresaba proteínas de fusión mostradas en la siguiente figura 7 además de la proteína de fusión mostrada en el ejemplo 13 y la figura 5. Todas las proteínas de fusión mostradas en la figura 7 se obtuvieron mediante PCR a partir de diferentes cebadores usando p117 8-28oPR como molde. Para p117 8-28oRR, esas variantes se construyeron para el fin de reducir el punto isoeléctrico de una proteína.
- 35

- Se transformó cada uno de los plásmidos que se espera que expresen cada proteína de fusión en la cepa W3110 de *Escherichia coli*, que se cultivó en un fermentador de 3 l a una escala de 2 l. Se realizó el precultivo en un caldo LB mediante agitación a 32°C durante 14 horas. La composición del medio del presente cultivo es igual al mostrado en el ejemplo 2. Inicialmente se añadió glucosa como fuente de carbono al medio de cultivo al 1% y se inició el cultivo a 32°C. Una vez agotada la glucosa, se añadió glicerol, seguido por cultivo. Y tras el agotamiento de glucosa, se elevó la temperatura de cultivo hasta 37°C y, tras el cultivo, se rompieron las células con una máquina de ruptura de células a presión (Mantongolin). Se determinó el resultado del cultivo mediante la turbidez final y la turbidez con la ruptura celular. Se determinó que la turbidez superior de una célula y la razón superior de turbideces antes y después de la ruptura celular se debía a una bacteria que tenía una productividad superior de cuerpos de inclusión. En la figura 8 se muestran los resultados en los gráficos A y B.
- 40
- 45

- Tal como se observa a partir de los gráficos A y B, a partir de una turbidez final y una razón de turbideces antes y después de la ruptura celular, la proteína de fusión 1178-28oRR mostró la productividad superior entre las proteínas de fusión construidas. A partir de los resultados de los ejemplos 13 y 14, se consideró que el plásmido p117 8-28oRR que expresa la proteína también es adecuado para el cultivo en el ejemplo 2.
- 50

Ejemplo 15: Estabilidad de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28)

- En los ejemplos 6, 7 y 8, se observó un fenómeno en el que aproximadamente del 1 al 10% de los grupos Boc se eliminan en [N<sup>α</sup>-Boc, Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]-(RHHGSGSPSRHRR)h-grelina (8-28) y [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). Puesto que incluso cuando se elimina uno de los grupos Boc añadidos de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28), esto conduce a una gran reducción en una tasa de condensación en una etapa de condensación, después se investigó la
- 55

estabilidad de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) con el fin de prevenir la eliminación de un grupo Boc.

Como parámetro que influye en la degradación, se contemplaron el pH durante el almacenamiento y la temperatura de almacenamiento. Entonces, se analizó la estabilidad en las siguientes condiciones y se evaluó mediante HPLC.

5 Método: Se disolvió [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) recién purificada en una disolución de acetato de sodio 30 mM, se ajustó el pH a 2, 3 ó 4 usando TFA y se ajustó el pH a 6, 7 u 8 usando NaOH 5 N, y esto se dejó estar en un baño a temperatura constante a 4°C, 20°C, 37°C o 42°C durante una semana. Tras el inicio de dejarlo estar, se realizó la toma de muestras a las 0 horas, 2 horas, 6 horas, 9 horas, 24 horas, 48 horas, 96 horas y 168 horas, y se analizaron las muestras mediante HPLC. Se realizó el análisis evaluando con el tiempo una razón (%) de un área pico de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) en relación con un área de pico total de los resultados del análisis con HPLC.

10 Resultados: En la figura 9 y la figura 10 siguientes se muestran cuatro tipos de gráficos que resumen cada temperatura de almacenamiento. Se observó que, a un pH inferior (pH 3 o inferior) y a una temperatura superior, aumenta el producto de degradación. Además, se observó que, a un pH de 4 o superior, [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) también es estable incluso a 42°C. Por tanto, se encontró que el control del pH es importante para suprimir la producción de este producto de degradación.

15 Ejemplo 16: Producción de h-grelina (1-28) (Método 2)

(1) Construcción del vector p117-8-28ok que expresa el derivado de h-grelina (8-28)

20 Según la misma manera que la del ejemplo 1, se obtuvo el plásmido p117-8-28ok. La diferencia entre el plásmido p117-8-28PR obtenido en el ejemplo 1 y el plásmido p117-8-28ok está sólo en que la secuencia de ligador del primero es EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR (SEQ ID NO: 26) y la secuencia de ligador del segundo es RRHHGSGSPSRHPR (SEQ ID NO: 35).

(2) Expresión de la proteína de fusión de h-grelina (8-28) recombinante en *Escherichia coli*

25 Se transformó el plásmido p117-8-28ok que se espera que exprese la proteína de fusión de h-grelina (8-28) en la cepa W3110 de *Escherichia coli* para obtener un transformante. Este transformante se cultivó en un medio de 20 l usando glucosa y glicerol como fuente de carbono, para obtener una disolución de cultivo que tiene un valor de DO<sub>660</sub> final de 54.

(3) Procesamiento de la proteína de fusión de h-grelina (8-28) con proteasa OmpT endógena

30 Se suspendieron células (aproximadamente 680 g) de la disolución de cultivo obtenida anteriormente (2) en 20 l de un tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) y se realizó el tratamiento de ruptura de las células dos veces usando un homogenizador de alta presión. Después, se recuperaron los cuerpos de inclusión mediante centrifugación y se lavaron los cuerpos de inclusión mediante la suspensión de nuevo en agua desionizada y la centrifugación de la suspensión. Entonces, se suspendió el sedimento de cuerpos de inclusión (peso húmedo de aproximadamente 170 g) obtenido mediante centrifugación en una cantidad pequeña de agua desionizada, para obtener 550 ml del concentrado de cuerpos de inclusión que tiene un valor de DO<sub>660</sub> de 826. Se tomaron 50 ml de 35 550 ml del concentrado de cuerpos de inclusión, se diluyeron con agua desionizada de modo que el valor de DO<sub>660</sub> fuera de 50,0, se añadieron Tris-HCl (pH 8,2) y EDTA (pH 8,0) hasta las concentraciones finales de 50 mM y 1 mM, respectivamente, y se disolvieron los cuerpos de inclusión en urea (concentración final 4,0 M). Se disolvieron los cuerpos de inclusión mediante urea para escindir entre Arg-Arg de una secuencia de ligador RRHHGSGSPSRHPR (SEQ ID NO: 35) con una proteasa OmpT endógena. Es decir, la disolución de reacción se mantuvo a 30°C durante 40 5 minutos y se sometió a tratamiento con proteasa OmpT a 30°C durante 15 minutos. Después, se añadió AcOH al 3% para detener la reacción. El presente tratamiento proporcionó 1,3 g de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28). Como resultado del análisis de una etapa de procesamiento, con una EM-ESI de 4019 (valor teórico 4018) de la proteína de fusión de h-grelina (8-28) con una proteasa OmpT endógena, mediante una cromatografía de líquidos de alta resolución, se demostró que RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28) se mantenía como forma soluble.

45 (4) Purificación de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28) (Purificación mediante intercambio catiónico)

50 Se cargó la disolución de reacción de la proteasa OmpT (900 ml) obtenida en (3) anterior en una columna de intercambio catiónico SP-Toyopearl 550-c (volumen de lecho 55 ml, 16 mm de DI x 280 mm fabricada por TOSOH) equilibrada con una disolución de equilibración (urea 1,5 M, NaCl 20 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3) en cuatro porciones. Se realizó la elución mediante un programa mediante el cual, tras el lavado suficiente de la columna con una disolución de equilibración, se completó un gradiente de concentración de un 75% de disolución de equilibración y un 25% de eluyente (urea 1,5 M, NaCl 1,5 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,3) hasta un 100% de eluyente en 1,5 volúmenes de columna. Se tomó una muestra cada 5 ml, se analizó cada fracción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y se tomaron fracciones que no contenían derivado de β-galactosidasa de *Escherichia coli*. Un rendimiento total de cuatro veces fue de aproximadamente 950 mg.

55 Se dividió el eluyente purificado mencionado anteriormente (660 ml) en dos mitades y se cargó dos veces en una

5 columna YMC-ODS AM (diámetro de partícula 20  $\mu\text{m}$ , fabricada por YMC) 21,5 mm de DI x 300 mm equilibrada con acetonitrilo al 2% y TFA al 0,1%. Tras el lavado suficiente con una disolución de equilibración, se eluyó la columna con un eluyente (acetonitrilo al 50%, TFA al 0,095%). Se tomó un pico de elución y se eliminó el acetonitrilo contenido en el eluyente con un evaporador giratorio para obtener 220 ml de una disolución que contiene 720 mg de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28). Las condiciones de cromatografía de líquidos de alta resolución usada en (3) y (4) se muestran a continuación:

Columna; YMC-ODS AP-302, detector; sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de Hitachi (D7000), velocidad de flujo; 1 ml/min., elución; gradiente de concentración lineal de 100% de un tampón A (acetonitrilo al 1,0%, TFA al 0,1%) hasta 100% de un buffer B (acetonitrilo al 50,0%, TFA al 0,1%) durante 20 minutos.

10 (5) T-butoxicarbonilación de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28)

15 Se transfirieron 220 ml de la muestra (que contiene 720 mg de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28)) obtenida en (4) a un matraz Erlenmeyer de vidrio y se añadió una cantidad equivalente de 220 ml de acetonitrilo. A esto se añadió dicarbonato de di-t-butilo 1 M a 4,4 ml (concentración final 10 mM, 25 equivalentes) correspondiente a una cantidad en moles de 5 veces del número (5 en total) de grupos  $\alpha$ -amino y grupos  $\epsilon$ -aminos de Lys presente en RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28). Además, se ajustó el pH a 9 con trietilamina, y se hicieron reaccionar los materiales a temperatura ambiente durante 60 minutos mientras se agitaba con un agitador. Se añadió ácido acético hasta la concentración final de 0,5% para detener la reacción para obtener un pH casi neutro y se eliminó rápidamente el acetonitrilo con un evaporador giratorio para obtener 300 ml de una disolución que contiene 530 mg de Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). EM-ESI; 4519 (valor teórico; 4518).

20 A juzgar por los perfiles de elución de RHHGSGSPSRHPR-h-grelina (8-28) antes y después de la butoxicarbonilación y los resultados de la medición de espectrometría de masas, se confirmó la producción de Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). Para monitorizar la presente reacción, se usó el siguiente sistema de cromatografía. Columna; YMC-C8, detector; sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de Hitachi (D7000), velocidad de flujo; 1 ml/min., elución; gradiente de concentración lineal del 100% de un tampón A (acetonitrilo al 1,0%, TFA al 0,1%) hasta un 100% de un tampón B (acetonitrilo al 60,0%, TFA al 0,095%) durante 20 minutos.

(6) Producción de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) con proteasa Kex2

30 Se purificó Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) obtenida en (5) con cromatografía en columna en fase inversa. Se equilibró la columna con acetonitrilo al 2%, TFA al 0,1% y acetato de sodio 10 mM a pH 4,5. Se cargó el derivado de Boc (aproximadamente 500 mg) en una columna YMC-ODS AM (diámetro de partícula 20  $\mu\text{m}$ , fabricada por TOSOH) 21,5 mm de DI x 300 mm. Tras el lavado suficiente con una disolución de equilibración, se eluyó la columna con un eluyente (acetonitrilo al 70%, TFA al 0,095%, acetato de sodio 10 mM, pH 4,5). Se recogió un pico de elución que contiene Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) (420 mg) y se eliminó el acetonitrilo con un evaporador. A la presente disolución se añadieron una disolución de cloruro de calcio 250 mM y Tris-HCl 1 M de pH 8,2 a las concentraciones finales de 5 mM y 50 mM, respectivamente. Tras mantenerse a 30°C durante 5 minutos, se añadió disolución de proteasa Kex2 (documento JP-A n.º 10-229884) (1x10<sup>7</sup> unidades/ml) a 3x10<sup>4</sup> unidades/ml, para que reaccionaran a 30°C durante 45 minutos.

Como resultado del análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución en la presente etapa, se demostró que se escindían una secuencia de ligador RHHGSGSPSRHPR y [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

40 (7) Purificación de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28)

45 Se ajustó la disolución tras la reacción (300 ml) que contenía [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) (320 mg) obtenida en (6) a un pH de 3,5 con ácido acético y se cargó en una columna de cromatografía en fase inversa ODS-80Ts (columna de 21,5 mm de DI x 300 mm (108 ml), diámetro de partícula 20  $\mu\text{m}$ , fabricada por TOSOH) equilibrada previamente con acetonitrilo al 10% y TFA al 0,095%. Se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de una disolución de equilibración y se ejecutó un programa en el que se completó un gradiente de concentración del 70% de un tampón A (acetonitrilo al 10%, TFA al 0,095%) y el 30% de un tampón B (acetonitrilo al 65%, TFA al 0,1%) hasta el 100% de un tampón B en 5 volúmenes de columna, para eluir así [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). Se recogieron las fracciones de eluyente (cada 5 ml) y se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (las condiciones son las mismas que las de (6)). Se recogieron las fracciones eluidas de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28), se concentraron y se liofilizaron para obtener 136 mg de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28). A partir de 1300 mg de un precursor (3) obtenido mediante el procesamiento con un derivado de proteasa OmpT, se obtuvieron 136 mg de una muestra final de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28).

(8-1) Síntesis del fragmento lateral N-terminal [N<sup>6</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu)]ghrelina (1-7) (Método 1)

55 Se construyó una resina de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-clorotritilo en una resina de prolil-2-clorotritilo (548 mg, 0,25 mmol, fabricada por Novabiochem) repitiendo sucesivamente la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU y de-Fmoc con piperidina para introducir Boc-Gly en un residuo N-terminal usando un sintetizador automático de péptidos. Se trató la resina con péptido protegido resultante (757 mg) con una disolución

de TBAF/DMF 0,1 M (5 ml) durante 1 hora. Se filtró la resina con péptido, se lavó con DMF (10 ml) algunas veces y se lavó con alcohol isopropílico y cloruro de metileno (10 ml). Entonces, se hinchó la resina con péptido de-TBDMS con DMF (10 ml) y se añadieron ácido octanoico (144,2 mg, 1,0 mmol) y EDC.HCl (211 mg, 1,1 mmol) en presencia de DMAP (31 mg, 0,25 mmol), para que reaccionaran durante 16 horas. Se filtró la resina, se lavó sucesivamente con DMF, alcohol isopropílico y cloruro de metileno, y se secó a presión reducida para obtener una resina con péptido protegido en la que la cadena lateral en la tercera serina se había sometido a octanoilación. A esto se añadieron 6 ml de una disolución mixta de 2 ml de ácido acético/2 ml de TFE/6 ml de cloruro de metileno, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora para escindir el péptido protegido de la resina. Se filtró la resina, se concentró el filtrado y se añadió éter al residuo para obtener precipitados. Se filtraron los precipitados y se secaron para obtener 248 mg de péptido en bruto (rendimiento 96%). Se disolvió el presente producto en aproximadamente 2 ml de una disolución mixta de ácido acético y acetonitrilo, y se añadió la disolución a YMC-Pack ODS-A (20 mm x 250 mm), seguido por la elución con un gradiente lineal (velocidad de flujo: 10 ml/min.) del 40% al 80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% durante 60 minutos. Se tomaron las fracciones deseadas y se liofilizaron para obtener 210 mg del producto deseado.

#### 15 (8-2) Síntesis del fragmento lateral N-terminal [N<sup>α</sup>-Boc, Ser<sup>2,6</sup>(tBu)]ghrelina (1-7) (Método 2)

Se construyó una resina de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-clorotritilo en una resina de prolil-2-clorotritilo (466 mg, 0,25 mmol, fabricada por Novabiochem) repitiendo sucesivamente la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU y de-Fmoc con piperidina para introducir Boc-Gly en un residuo N-terminal usando un sintetizador automático de péptidos. Se trató esta resina con TFA al 1%, TIPS/diclorometano al 5% durante 30 minutos, para realizar la eliminación de un grupo Trt y la escisión de la resina al mismo tiempo. Una vez filtrada la resina, se eliminó por destilación el diclorometano a presión reducida para concentrar el material y se añadió Et<sub>2</sub>O para obtener precipitados, que se secaron para obtener 165 mg de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OH como precipitados blancos. Entonces, se añadieron bromuro de fenacilo (40 mg, 1,1 equivalentes) y trietilamina (20 mg, 1,1 equivalentes) para que reaccionaran durante 2 horas en aproximadamente 3 ml de DMF. Tras la reacción, se colocó la disolución de reacción en una cantidad de aproximadamente 5 veces de acetato de etilo y se lavó la mezcla con agua y una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Se secaron los precipitados formados con la adición de Et<sub>2</sub>O para obtener Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OPac como precipitados blancos. Entonces, se añadieron ácido octanoico (18,2 mg, 1,1 equivalentes), EDC.HCl (26,4 mg, 1,2 equivalentes) y DMAP (1,4 mg, 0,1 equivalentes) para que reaccionaran durante la noche en aproximadamente 2 ml de DMF. Se colocó la disolución de reacción en una cantidad de aproximadamente 5 veces de acetato de etilo, se lavó con agua y se añadió una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, sulfato de sodio para secarla, y esto se filtró, se concentró, se añadió Et<sub>2</sub>O para obtener 144 mg de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Octanoil)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OPac como precipitados blancos. Entonces, se añadieron 1,5 ml de ácido acético y polvo de zinc (163 mg, 20 equivalentes) para que reaccionaran durante 1 hora, esto se filtró y se añadió agua fría para obtener precipitados, que se lavaron con Et<sub>2</sub>O y se secaron. Se obtuvieron 65 mg de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Octanoil)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OH como precipitados blancos. Se disolvió el producto en aproximadamente 2 ml de una disolución mixta de ácido acético acuoso y acetonitrilo, se añadió la disolución a YMC-Pack ODS-A (20 mm x 250 mm), y esto se eluyó con un gradiente lineal (velocidad de flujo: 10 ml/min.) del 40% al 80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% durante 60 minutos. Se tomaron las fracciones deseadas y se liofilizaron para obtener 50 mg del producto deseado.

#### 50 (9) Condensación y desprotección de fragmentos

Se cuantificaron [N<sup>α</sup>-Boc, Ser(tBu)<sup>2,6</sup>]ghrelina (1-7) y [Lys<sup>16,19,21,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) obtenidos en (8-1) y (7) de antemano usando un analizador de aminoácidos y se sometieron a una reacción de condensación. Se disolvieron 19,3 μmol de [N<sup>α</sup>-Boc, Ser(tBu)<sup>2,6</sup>]ghrelina (1-7), 20,3 μmol de HBTU y 20,3 μmol de DIPEA en 500 μl de DMF y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se disolvieron 18,4 μmol de [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28) y 55,2 μmol de DIPEA en 1 ml de DMF, y se añadió gota a gota la disolución de fragmento lateral N-terminal activado mencionada anteriormente mientras se agitaba. Tras tres horas, se eliminó por destilación la reacción a presión reducida y se añadió Et<sub>2</sub>O al residuo para obtener precipitados, que se lavaron y secaron. Al polvo resultante se añadieron 3 ml de TFA y se agitó la mezcla lentamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó por destilación TFA a presión reducida y se añadió Et<sub>2</sub>O al residuo para obtener precipitados, que se lavaron y se secaron para obtener 77 mg del péptido en bruto en polvo blanco. Esto se analizó mediante HPLC analítica y, como resultado, la pureza del producto deseado en un gráfico fue del 83% y el tiempo de retención fue coherente con el de un producto obtenido mediante síntesis química. Además, se coinyectaron un producto semi-sintético y un producto completamente sintético, y los picos en el cromatograma fueron coherentes.

#### 55 (10) Purificación de h-grelina (1-28)

Se disolvieron 67 mg de la h-grelina en bruto en polvo blanca obtenida en (9) en ácido acético al 1% a 1 mg/ml, y se cargó la disolución en una columna de cromatografía en fase inversa TSK-ODS-80Ts de 108 ml (DI 21,5 mm x 300 mm) equilibrada con ácido acético 0,1 M. Tras el lavado con 2 volúmenes de columna de una disolución de equilibración, se ejecutó un programa mediante el cual se completó un gradiente de concentración de desde el 100% de un tampón A (ácido acético 0,1 M) hasta el 100% de un tampón B (acetonitrilo al 40%, ácido acético 0,1 M) en 5 volúmenes de columna, para eluir así la h-grelina (1-28). Se recogieron fracciones que tenían alta pureza y se

liofilizaron para obtener 34,4 mg de h-grelina (1-28).

EM-ESI 3371 (valor teórico 3370,86), razón de composición de aminoácidos tras hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N, Ala; 1,01 (1), Arg; 2,97 (3), Glx; 5,95 (6), Gly; 1,02 (1), His; 1,00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 4,01 (4), Phe; 1,00 (1), Pro; 4,01 (4), Ser; 3,60 (4), Val; 1,00 (1) (valor teórico entre paréntesis), actividad de movilización de Ca 1,3 nM (ref.1,5 nM)

- 5 Ejemplo 17: Optimización de condición de de-TBDMS y condición de octanoilación de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OH

10 Según la misma manera que la del método del ejemplo 16 (8-1), se estudió la condición de optimización de una reacción para eliminar un grupo TBDMS de la tercera serina y una reacción de octanoilación. Se construyó una resina de Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-clorotritilo en una resina de prolil-2-clorotritilo repitiendo sucesivamente la introducción de Fmoc-aminoácido con HBTU y de-Fmoc con piperidina, para introducir Boc-Gly en un residuo N-terminal usando un sintetizador automático de péptidos (433A fabricado por Applied Biosystem, Japón). Entonces, se subdividió la resina en 0,05 mmol (aproximadamente 150 mg) y se sometió a octanoilación en las condiciones mostradas en la tabla 3 y la tabla 4. Las condiciones de lavado de una resina y la escisión del péptido de la resina son las mismas que las del ejemplo 16 (8-1).

- 15 Como resultado, quedó claro que se realiza preferiblemente una reacción de eliminar un grupo TBDMS durante de 30 minutos a 1 hora usando una disolución de TBAF 0,1 M y se realiza preferiblemente una reacción de octanoilación durante de 8 a 16 horas usando 4 equivalentes de ácido octanoico, 4,4 equivalentes de EDC y 1 equivalente de DMAP.

Tabla 3

- 20 Reacción de eliminación del grupo TBDMS <sup>a</sup>

	TBAF (M)	Tiempo de reacción (horas)	Rendimiento <sup>b</sup> (%)	Pureza del producto deseado <sup>c</sup> (%)	Razón <sup>c</sup>	
					Octanoilo	desoctanoilo
I	0,01	0,25	89	94	98,3	: 1,7
II	0,01	3	100	97	100	: N.D. <sup>d</sup>
III	0,1	0,25	94	97	100	: N.D.
IV	0,1	0,5	100	96	100	: N.D.
V	0,1	1	98	96	100	: N.D.
VI	0,1	3	100	96	100	: N.D.

- 25 a; Se obtuvo una tasa de eliminación del grupo TBDMS como una razón de un compuesto de octanoilo y un compuesto de desoctanoilo que muestra no eliminación TBDMS, obteniéndose estos compuestos mediante la octanoilación de una resina con péptido tratado con TBAF, seguido por desprotección. Se realizó la octanoilación mediante una reacción durante 24 horas usando 4 equivalentes de ácido octanoico, 4,4 equivalentes de EDC y 1 equivalente de DMAP.

b; Calculado basándose en una tasa de sustitución de una resina de prolil-2-clorotritilo.

c; Se calcularon la pureza del producto deseado y la tasa mediante HPLC analítica.

d; N.D. No detectado.

Tabla 4 Reacción de octanoilación en serina en posición 3 <sup>a</sup>

	Ácido octanoico (equivalente)	EDC (equivalente)	DMAP (equivalente)	Tiempo de reacción (hora)	Rendimiento <sup>b</sup> (%)	Pureza del producto deseado <sup>c</sup> (%)	Razón <sup>c</sup>	
							Octanoilo	desoctanoilo
VII	4	4,4	0,1	24	83	94	97,2	: 2,8
VIII	2	2,2	1	24	93	96	99,5	: 0,5
IX	4	4,4	1	1	85	78	80,5	: 19,5

X	4	4,4	1	4	98	97	99,7	:	0,3
XI	4	4,4	1	8	98	96	100	:	N.D. <sup>d</sup>
XII	4	4,4	1	16	97	98	100	:	N.D.

a; Todas las muestras se trataron con TBAF 0,1 M durante 1 hora, para eliminar un grupo TBDMS.

b; Calculado basándose en una tasa de sustitución de una resina de prolil-2-clorotritilo.

c; Se calcularon la pureza del producto deseado y la tasa mediante HPLC analítica.

d; N.D. No detectado.

5 Ejemplo 18: Estudio de la condición de condensación de fragmentos

Se estudiaron las eficacias de reacción de diversos reactivos de condensación usando [N<sup>α</sup>-Boc, Ser(tBu)<sup>2,6</sup>]h-grelina (1-7) y [Lys<sup>16,19,20,24</sup>(Boc)]h-grelina (8-28), quedó claro que HBTU obtenía el mejor resultado, pero la reacción también continúa en EDC/ HOBt, EDC/HOSu y DPPA.

Tabla 5

10 [N<sup>α</sup>-Boc, Ser(tBu)<sup>2,6</sup>]ghrelina (1-7)+h-grelina (8-28)

Reactivo de condensación	Tiempo de reacción	Pureza del producto deseado (calculada a partir de HPLC)
HBTU	5 horas	83%
EDC/HOBt	16 horas	74%
EDC/HOSu	16 horas	40%
DPPA	24 horas	19%

Aplicabilidad industrial

Según el método de la presente invención, puede obtenerse una proteína o péptido modificado que tiene una calidad muy alta con alto rendimiento.

**Lista de secuencias**

15 <110> Daiichi Suntory Pharma Co., Ltd.

<110> Kenji KANGAWA

<120> Método para producir un péptido modificado

<130> D05F1044

<150> PCT/JP03/04590

20 <151> 10-04-2003

<160> 39

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos humanos de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos humanos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

10 <210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rata de secretagogo de hormona de crecimiento

15 <400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

20 <213> *Rattus norvegicus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rata (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 4

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de ratón de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 5

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

<210> 6

10 <211> 28

<212> PRT

<213> *Sus scrofa* (cerdo)

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos porcinos de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 6

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

20

25

15 <210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

20 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos bovinos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg

20 25

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Ovis aries*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos ovinos (27 aminoácidos) de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 8

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Pro Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg

20 25

10 <210> 9

<211> 28

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de perro de secretagogo de hormona de crecimiento

15 <400> 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

20 <213> *Anguilla japonica*

<220>

<221> AMIDACIÓN



Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys

1 5 10 15

Pro Pro Arg Val

20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

5 <213> *Gallus domesticus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 13

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys

1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg

20

<210> 14

10 <211> 24

<212> PRT

<213> *Gallus domesticus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 14

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys

1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg

20

15 <210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> *Gallus domesticus*

20 <223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de pollo de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 15

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys

1 5 10 15

Asp Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg Leu His

20 25

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Rana cafesbeiana*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rana de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 16

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met

20 25

<210> 17

10 <211> 28

<212> PRT

<213> *Rana cafesbeiana*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos de rana de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 17

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Asn

20 25

15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> *Tilapia nilotica*

20 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> 20



<212> PRT

<213> *Equus caballus*

<223> Secuencia de aminoácidos para péptidos endógenos equinos de secretagogo de hormona de crecimiento

<400> 21

**Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His His Lys Val Gln His Arg Lys**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Lys Pro Arg**

**20**

**25**

5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos adyacentes a un sitio escindido por enterocinasa

<400> 22

**Asp Asp Asp Lys**

**1**

<210> 23

15

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos adyacentes a un sitio escindido por el factor Xa de coagulación sanguínea

20

<400> 23

**Ile Glu Gly Arg**

**1**

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos que contiene un sitio escindido por renina

<400> 24

Pro Phe His Leu Leu Val Tyr

1

5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<400> 25

Val Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

10 <210> 26

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de ligador en la proteína de fusión p117 8-28oPR

<400> 26

Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp

1

5

10

15

Ala Asp Val Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser

20

25

30

Arg His Pro Arg

35

<210> 27

<211> 36

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ligador en la proteína de fusión p117 8-28oRR

<400> 27

**Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp**  
**1 5 10 15**  
**Ala Asp Val Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser**  
**20 25 30**  
**Arg His Arg Arg**

<210> 28

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ORI-RR

<400> 28

ggttcgggat ccccttctcg acatgcgagg gaacac 36

10 <210> 29

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador SAL\*R

<400> 29

ataagtcgac ttatcgtggc tgcag 25

<210> 30

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<400> 30

**Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Arg Arg**

25 **1 5 10**

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<400> 31

Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Pro Arg

5            1                            5                            10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223>

<400> 32

Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Lys Arg

1                            5                            10

<210> 33

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

20 <400> 33

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1                            5

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<400> 34

**Phe Leu Ser Pro**

**1**

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ligador

<400> 35

**Arg Arg His His Gly Ser Gly Ser Pro Ser Arg His Pro Arg**

**1**

**5**

**10**

10 <210> 36

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> h8-28f1

<400> 36

**tccccgcggg aacaccagcg cgtccag 27**

<210> 37

<211> 33

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> h8-28r1

<400> 37

25 **acgctgctgg acgcgctggt gttcccggg gga 33**

<210> 38

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> GR2f

<400> 38

cagcgttaagg aatccaagaa gccaccagct aaactgcagc cacgatgag 49

<210> 39

<211> 44

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GR2r

<400> 39

tcgactcatc gtggctgcag tttagctggc ttctggatt cctt 44

10

## REIVINDICACIONES

1. Método para producir un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados, en el que al menos un aminoácido o no aminoácido está modificado tal como se representa mediante la fórmula 1; -A(R)-, en la que, A representa un aminoácido o un no aminoácido, y R representa un sustituyente unido a una cadena lateral de A que se introduce para modificación,
- 5 en el que el no aminoácido es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en  $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-C}(\text{CH}_3\text{)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3\text{)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}(\text{CH}_3\text{)-COOH}$ ,  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$  y  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$  en los que  $\text{R}_{11}$  representa una cadena lateral de un aminoácido natural,
- 10 que comprende:
- (a) preparar, en una resina a base de tritilo, un fragmento de péptido que tiene una secuencia deseada que comprende aminoácidos o/y no aminoácidos, en el que uno o más grupos funcionales reactivos en una cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido que pueden producir una reacción secundaria no deseada en la preparación de un fragmento de péptido están protegidos con un grupo protector, seleccionándose el uno o más grupos funcionales reactivos del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, y un grupo funcional reactivo en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A que va a modificarse con un sustituyente R se protege con un grupo protector de sililo,
- 15 (b) eliminar el grupo protector de sililo sin escindir el fragmento de péptido de la resina a base de tritilo usando un fluoruro de amonio cuaternario, cuando el grupo protector de sililo se introduce en un grupo funcional reactivo en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido A que va a modificarse con un sustituyente R, en el que el grupo protector de sililo es t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), triisopropilsililo (TIPS), triisobutilsililo (TIBS), t-hexildimetilsililo (ThxDMS) o trifenilsililo (TPS), y el fluoruro de amonio cuaternario es fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF), fluoruro de tetraetilamonio (TEF) o fluoruro de amonio,
- 20 (c) modificar la cadena lateral desprotegida con un sustituyente R, y
- (d) escindir el fragmento de péptido de la resina a base de tritilo en condiciones débilmente ácidas usando una disolución que contiene ácidos carboxílicos y/o alcoholes fluorados sin eliminación del grupo protector, tal como se define en la etapa (a), en el fragmento de péptido.
- 25
2. Método para producir un fragmento de péptido protegido según la reivindicación 1, en el que el grupo protector de grupo  $\alpha$ -amino en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo alcóxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente, un grupo cicloalquiloxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente, un grupo aralquiloxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente, un grupo aralquilo que tiene opcionalmente un sustituyente, un grupo acilo que tiene opcionalmente un sustituyente, ditiasuccinoilo, 2-nitrofeniltio, difenilfosfinilo, difenilfosfinotioilo y dimetilfosfinotioilo;
- 30 el grupo protector del grupo hidroxilo en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo alcanóilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo aroilo, un grupo benciloxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo;
- 35 el grupo protector del grupo guanidino de arginina en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo nitro, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo p-toluenosulfonilo, un grupo p-metoxibencenosulfonilo, un grupo 4-metoxi-2,6-dimetilbencenosulfonilo, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, un grupo mesitilen-2-sulfonilo, un grupo 2,3,4,5,6-pentametilbencenosulfonilo, un grupo 2,4,6-trimetoxibencenosulfonilo, un grupo 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo y un grupo 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo;
- 40 el grupo protector del grupo mercapto de cisteína en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo tritilo, un grupo acetamidometilo, un grupo terc-butilo, un grupo bencilo, un grupo p-metilbencilo, un grupo p-metoxibencilo, un grupo 3-nitro-2-piridinsulfenilo y un grupo butiltio;
- 45 el grupo protector del grupo imidazolilo de histidina en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo t-butoxicarbonilo, un grupo tritilo, un grupo p-toluenosulfonilo, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, un grupo 2,4-dinitrofenol, un grupo benciloximetilo, un grupo t-butoximetilo y un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo;
- 50 el grupo protector del grupo indolilo de triptófano en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo formilo, un grupo benciloxicarbonilo, un grupo 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, un grupo tricloroetiloxi-carbonilo, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo y un grupo 2,4,6-trimetoxibencenosulfonilo; y
- 55

el grupo protector del grupo carboxilo en el fragmento de péptido se selecciona del grupo que consiste en un grupo éster alquílico, un grupo éster aralquílico, un grupo éster fenacílico, un grupo benciloxicarbonilhidrazida, un grupo t-butoxicarbonilhidrazida y un grupo tritilhidrazida.

5 3. Método para producir un fragmento de péptido según la reivindicación 2, en el que el grupo alcoxicarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente es t-butoxicarbonilo, tricloroetiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetoxicarbonilo, metilsulfoniletoxicarbonilo, tricloroetoxicarbonilo, 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo o piridin-4-metoxicarbonilo;

el grupo cicloalquilocarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente es cicloheptiloxicarbonilo o ciclohexiloxicarbonilo;

10 el grupo aralquilocarbonilo que tiene opcionalmente un sustituyente es benciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 2-fenilisopropiloxicarbonilo, p-metilfenilisopropiloxicarbonilo, p-bifenilisopropiloxicarbonilo o 3,5-dimetoxi- $\alpha,\alpha$ -dimetilbenciloxicarbonilo;

el grupo aralquilo que tiene opcionalmente un sustituyente es bencilo, benzhidrido o tritilo;

15 el grupo acilo que tiene opcionalmente un sustituyente es trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo o 3-nitro-2-piridilsulfenilo;

el grupo alcanofilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono es un grupo acetilo;

el grupo aroilo es un grupo benzoilo;

20 el grupo éster alquílico es éster metílico, éster etílico, éster propílico, éster butílico, éster t-butílico, éster ciclopentílico, éster ciclohexílico, éster cicloheptílico, éster ciclooctílico o éster 2-adamantílico; y

el grupo éster aralquílico es el grupo éster bencilico, éster 4-nitrobencilico, éster 4-metoxibencilico, éster 4-clorobencilico o éster benzhidrílico.

25 4. Método para producir un fragmento de péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la resina a base de tritilo es resina de 2-clorotritilo, resina de tritilo, resina de 4-metiltritilo, resina de 4-metoxitritilo o resina de Rink Barlos.

5. Método para producir un fragmento de péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el grupo protector de sililo es t-butildimetilsililo (TBDMS).

6. Método para producir un fragmento de péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fluoruro de amonio cuaternario es fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF).

30 7. Método para producir un fragmento de péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los ácidos carboxílicos son ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido fórmico y los alcoholes fluorados son trifluoroetanol o hexafluoroisopropanol.

35 8. Método para producir un fragmento de péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que A es serina, treonina, cisteína, homocisteína, lisina, ornitina, ácido glutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido diaminoacético, ácido 2-aminomalónico, ácido aspártico, tirosina o asparagina, y R está unido a un sustituyente reactivo en la cadena lateral de A a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace disulfuro, un enlace amida, un enlace O-glicosídico o un enlace N-glicosídico.

9. Método para producir un fragmento de péptido según la reivindicación 8, en el que A es serina o treonina, y R está unido al grupo hidroxilo en la cadena lateral de A a través de un enlace éster.

40 10. Método para producir un fragmento de péptido según la reivindicación 9, en el que el fragmento de péptido es ghrelina o un derivado de la misma, o un fragmento de péptido que contiene un aminoácido modificado en la ghrelina o un derivado del mismo.

11. Método para producir una proteína o péptido modificado, que comprende

45 (a) preparar un fragmento de péptido protegido que contiene uno o más aminoácidos o no aminoácidos modificados mediante el método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

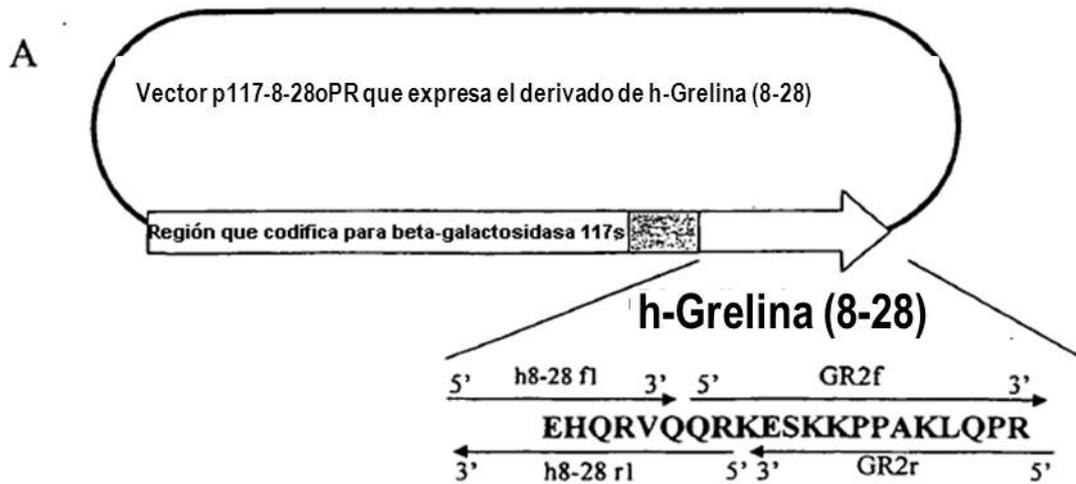
(b) preparar un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido modificado, y en el que uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en la cadena lateral de un aminoácido o un no aminoácido, están protegidos, además del fragmento de péptido de (a), y

50

(c) condensar fragmentos de péptido preparados en (a) y (b).

12. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 11, en el que la condensación de los fragmentos de péptido se realiza mediante el uso de un agente de condensación.
- 5 13. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 12, en el que el agente de condensación es hexafluorofosfato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1-hidrobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), difenilfosforilazida (DPPA), difenilfosforocianidato (DEPC), diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).
- 10 14. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 12, en el que el agente de condensación es diisopropilcarbodiimida (DIPC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y la condensación de los fragmentos de péptido (a) y (b) usando el agente de condensación se realiza en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxisuccinimida (HOSu) o 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-benzotriazina (HOObt).
- 15 15. Método para producir una proteína o péptido modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende producir un fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado, mediante un método enzimático o/y un método de recombinación genética.
- 20 16. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 13, en el que el fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado se produce mediante un método que comprende:
- 25 etapa (1): una etapa de poner en cultivo una célula transformada con un vector de expresión que tiene una de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del fragmento de péptido (denominado a continuación en el presente documento péptido deseado, en la presente reivindicación 16) y una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de fusión opcionalmente con un péptido protector añadido al péptido deseado a través de una secuencia de ligador, y recoger la proteína de fusión o el péptido deseado del cultivo;
- etapa (2): una etapa de escindir y separar el péptido protegido y, opcionalmente, la secuencia de ligador y el péptido deseado de la proteína de fusión resultante, y opcionalmente purificar adicionalmente el péptido deseado cuando la proteína de fusión se recoge en la etapa (1); y
- 30 etapa (3): una etapa de proteger, con un grupo protector, uno o más grupos funcionales reactivos que pueden producir una reacción secundaria no deseada, seleccionados del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo imidazolilo, un grupo indolilo, un grupo mercapto y un grupo carboxilo, en la cadena lateral del péptido deseado obtenido en la etapa (1) o en la etapa (2).
- 35 17. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 16, en el que la escisión y separación del péptido protector y, opcionalmente, la secuencia de ligador y el péptido deseado en la etapa (2) se realiza en dos etapas usando una proteasa OmpT o un derivado de la misma y la proteasa Kex2 o un derivado de la misma.
18. Método para producir una proteína o péptido modificado según la reivindicación 16 ó 17, en el que la secuencia de ligador es una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27.
- 40 19. Método para producir una proteína o péptido modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el fragmento de péptido es un fragmento de péptido que contiene aminoácido no modificado o no aminoácido en ghrelina o un derivado de la misma.
20. Método para producir una proteína o péptido modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el fragmento de péptido protegido que no contiene aminoácido o no aminoácido modificado se purifica y almacena en una disolución que tiene un pH de 4 a 8.
- 45 21. Método para producir una proteína o péptido modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que el grupo protector es un grupo Boc.

Fig. 1



h8-28 f1 5'- TCCCCGCGGGAACACCAGCGCGTCCAG -3'

GR2f 5'- CAGCGTAAGGAATCCAAGAAGCCACCAGCTAAACTGCAGCCACGATAG -3'

GR2r 5'- TCGACTCATCGTGGCTGCAGTTTAGCTGGCTTCTTGGATTCCCTT -3'

h8-28 r1 5'- ACGCTGCTGGACGCGCTGCTGTTCCCGCGGGA -3'

**Oligo-ADN sintéticos usados en el método de hibridación**

- h8-28 f1, GR2f, h8-28 r1 y GR2r son secuencias de nucleótidos de oligo-ADN sintético
- Las bases subrayadas en negrita en las secuencias GR2f y GR2r son un codón de terminación y un extremo cohesivo del sitio de escisión de Sall.
- Ambas bases subrayadas en las secuencias h8-28 f1 y h8-28 r1 corresponden al sitio de escisión Sall.

 corresponde a una secuencia de ligador EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR.

B

Beta-galactosidasa 117s	Secuencia de ligador	h-Grelina (8-28)
-------------------------	----------------------	------------------

Secuencia de ligador EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR

h-Grelina (8-28) EHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Fig. 2

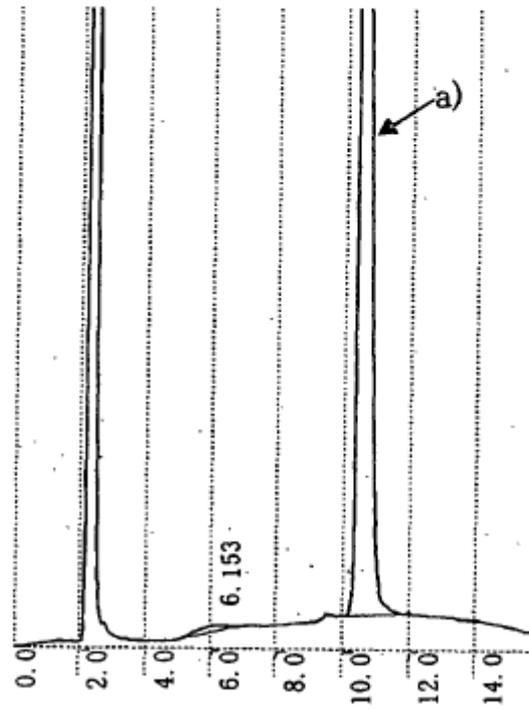


Fig. 3

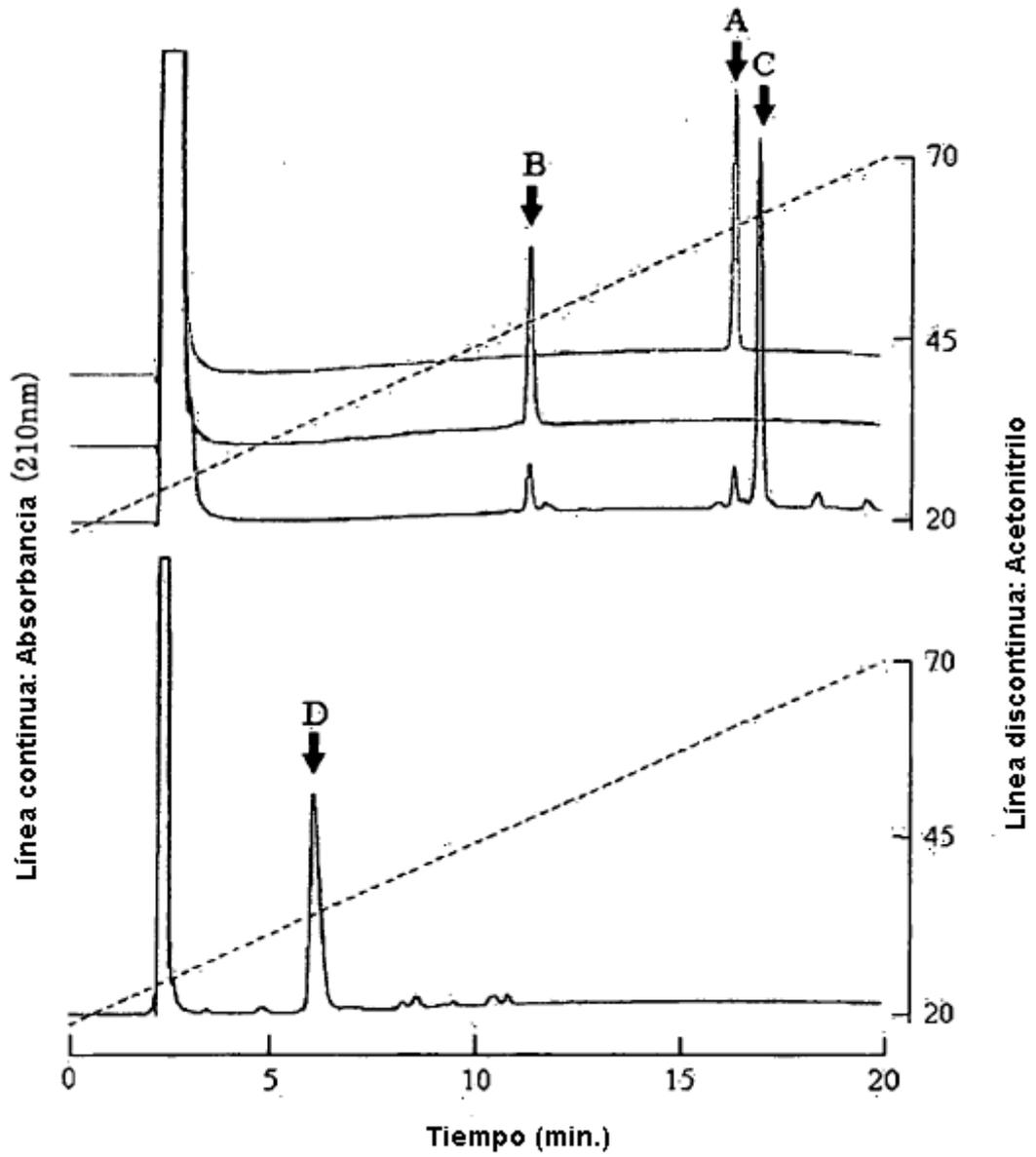


Fig. 4

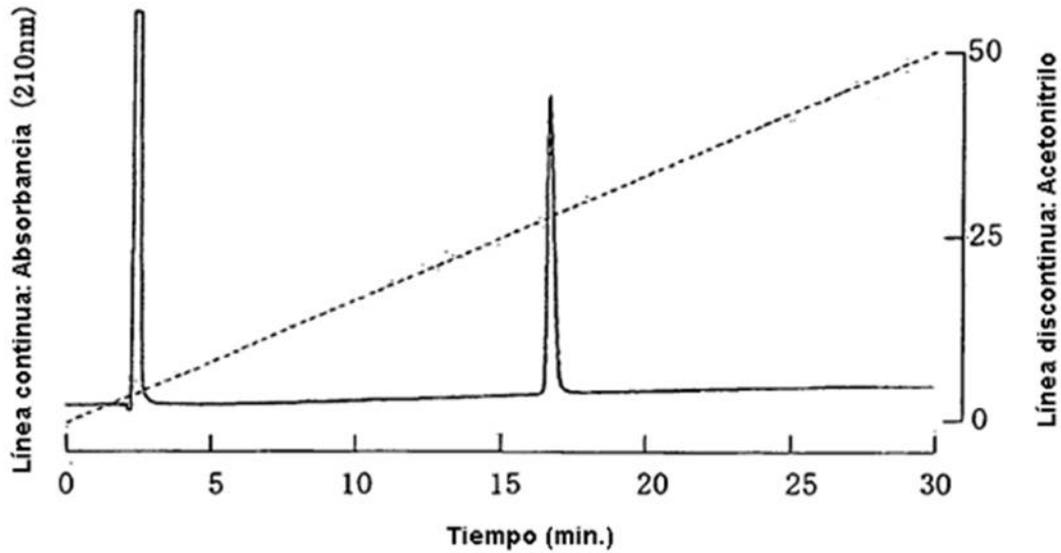


Fig. 5

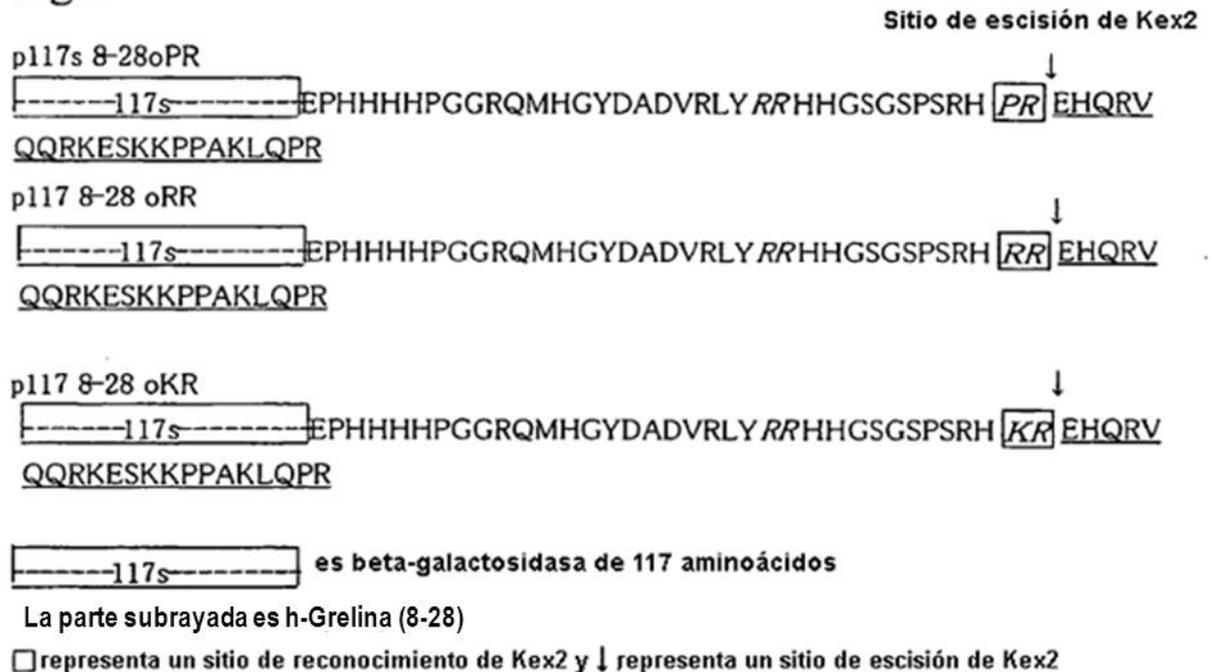


Fig. 6

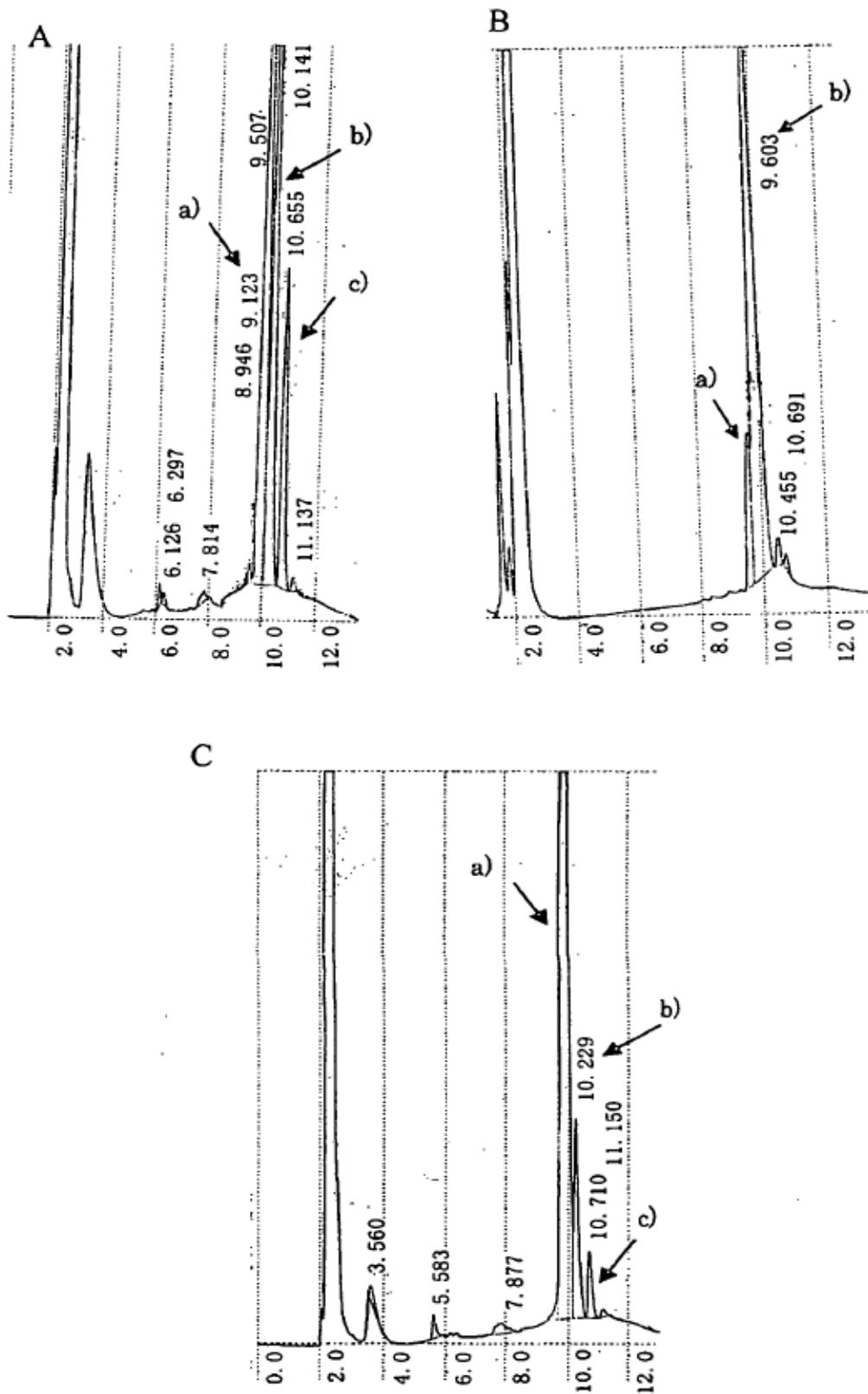
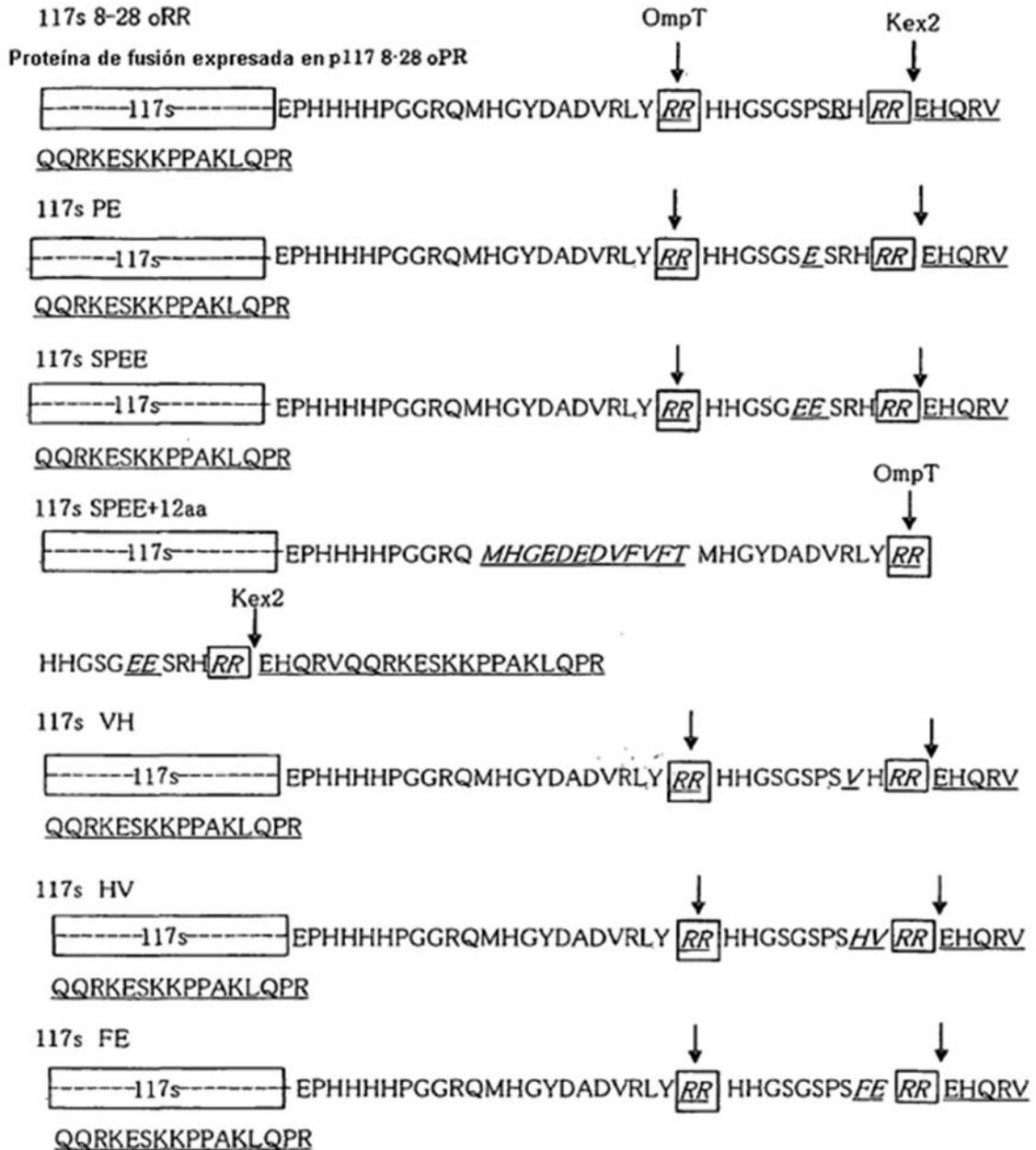


Fig. 7



117s es beta-galactosidasa de 117 aminoácidos

La parte subrayada es h-Grelina (8-28)

RR y RR representan sitios de reconocimiento de escisión de OmpT y Kex2.

La parte subrayada en cursiva representa un residuo en el que se introduce una mutación.

Fig. 8

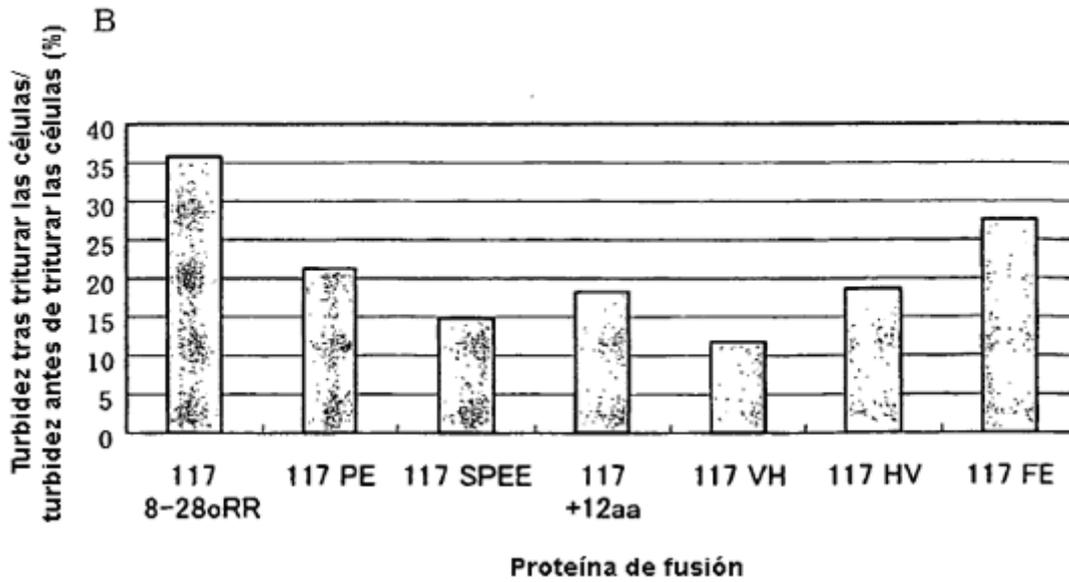
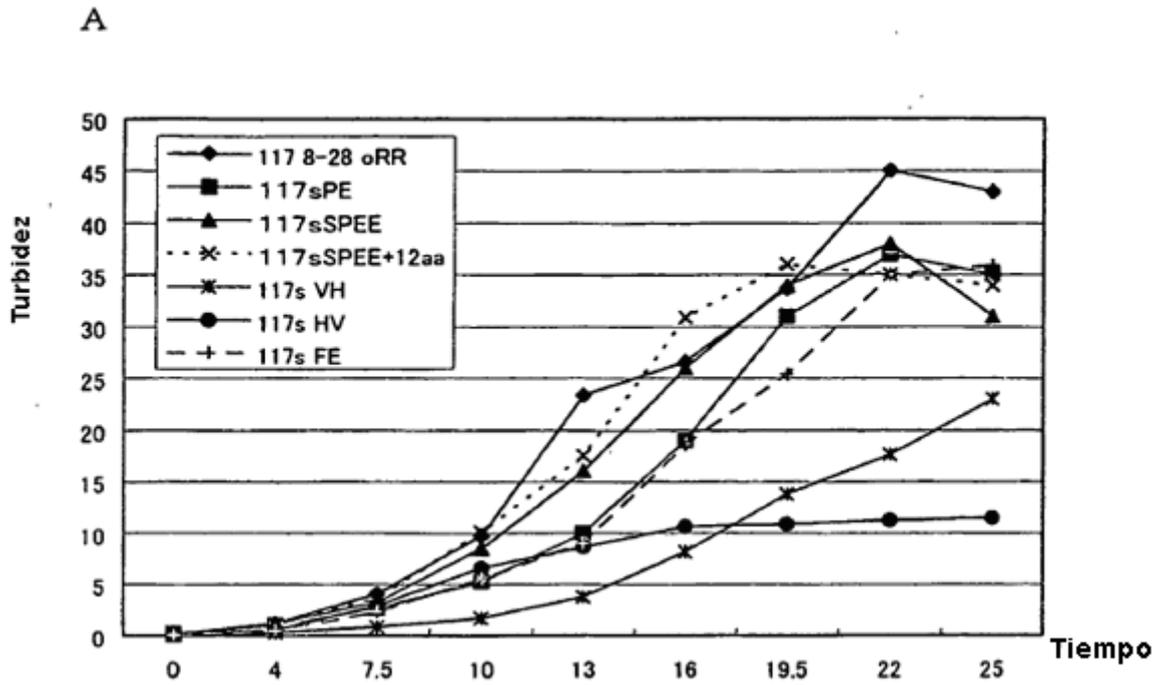


Fig. 9

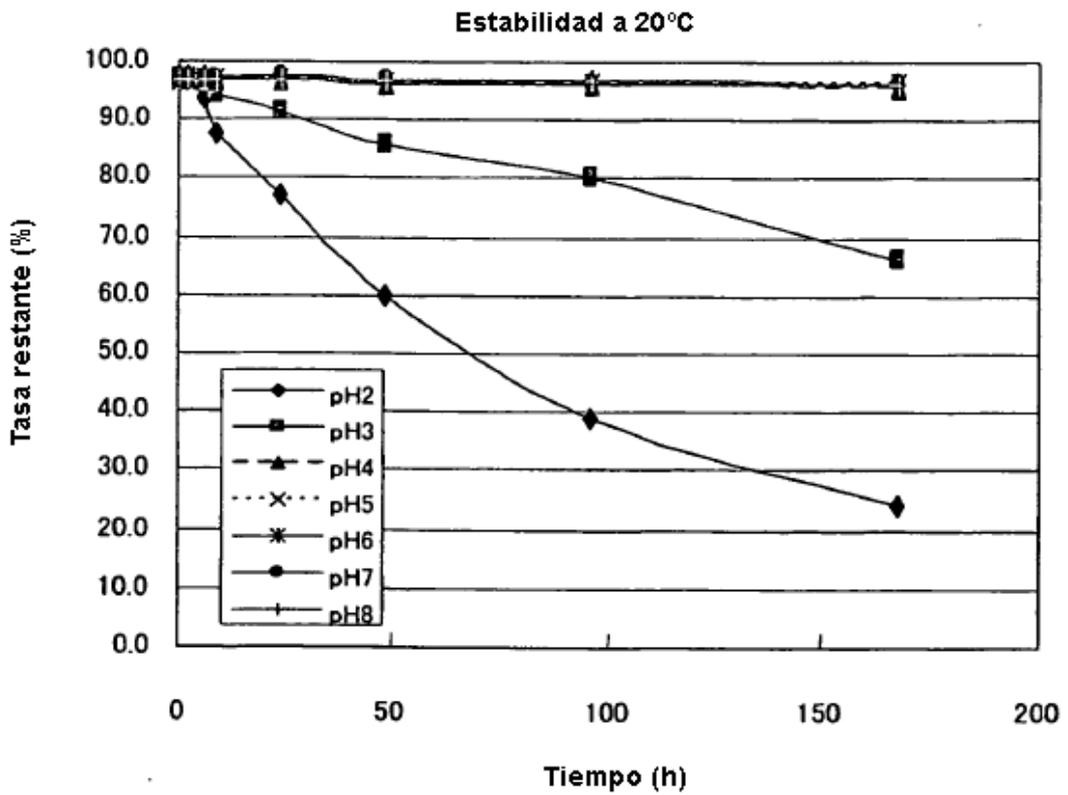
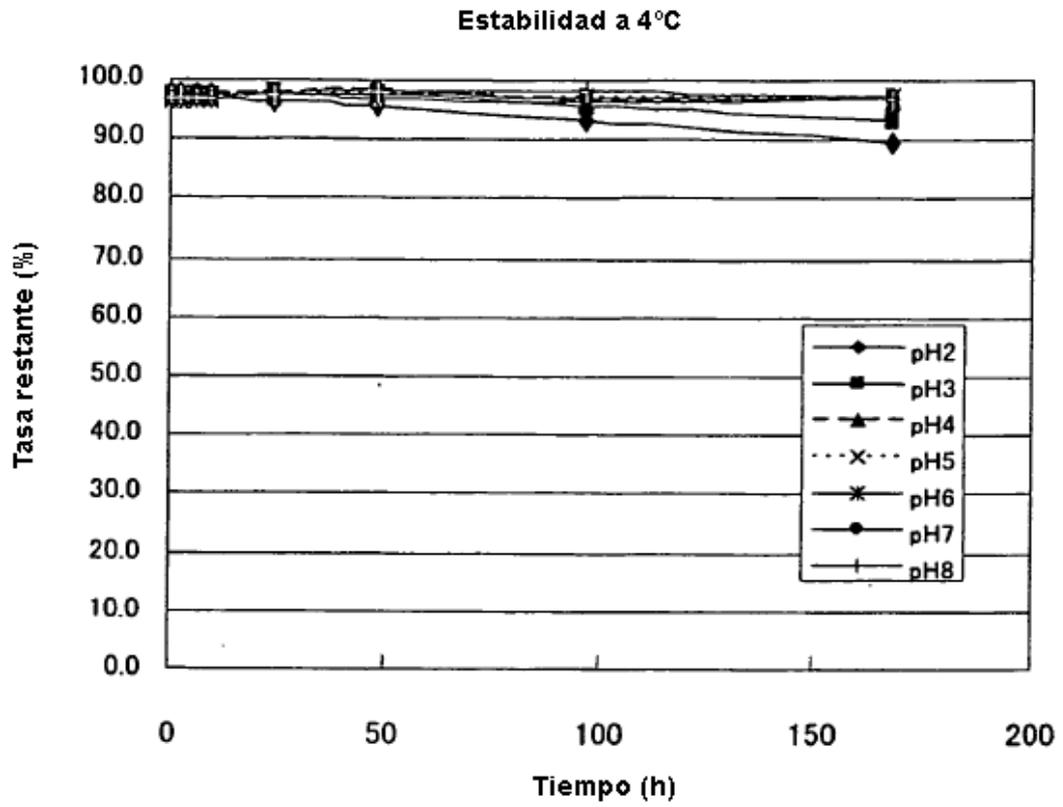


Fig. 10

