

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 829**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08829747 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2207790**

54 Título: **Péptidos que contienen arginina C-terminal biológicamente activos**

30 Prioridad:

05.09.2007 US 967644 P

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

17.12.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 , US

72 Inventor/es:

WILKINS, JAMES;
SHIRATORI, MASARU, KEN y
BREECE, TIM

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 434 829 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

Péptidos que contienen arginina C-terminal biológicamente activos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a la separación, identificación y caracterización de fragmentos de péptidos activos de peptonas.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 [0002] Los hidrolizados de tejidos de animales y plantas se añaden a menudo a medios de cultivo para reforzar en las procarionas y eucariotas el número de células viables y el título de productos proteicos recombinantes. De este modo, se han utilizado ampliamente las peptonas de diversas fuentes en formulaciones de medios de cultivo celular para aumentar el crecimiento, la longevidad y la productividad del cultivo celular. Sin embargo, su presencia como aditivos del medio para la producción de proteínas terapéuticas presenta varios desafíos debido a su naturaleza no definida.

20 [0003] La utilización de componentes derivados de animales como aditivos del medio para la producción de proteínas terapéuticas por células de mamíferos pueden causar contaminaciones virales, por micoplasma y priones (Kalle et al., J. Biotechnol. 95:195-204 (2002)). El esfuerzo para evitar la utilización de componentes derivados de animales en medios de cultivo celular está apoyado por las autoridades reguladoras europeas y americanas (Castle y Roberston, Dev. Biol. Stand. 99:191-196 (1999)). En las últimas décadas se ha eliminado satisfactoriamente el suero de animal y la mayoría de los medios utilizados actualmente se certifican como libres de proteínas (Froud, Dev. Biol. Stand. 99:157-166 (1999)). Sin embargo, el cambio a medios libres de proteínas da lugar a menudo a una pérdida de crecimiento y productividad celular (Lee et al., J. Biotechnol. 69:85-93 (1999)).

25 [0004] Como resultado, los hidrolizados de proteínas (también conocidos como peptonas) se utilizan frecuentemente en medios de cultivo celular como aditivos de nutrientes porque algunos de ellos se pueden considerar como libres de proteínas (Burteau et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim. 39 (7):291-296 (2003), US-A1-2004/0138428, EP-A2-0810283 y "BD Bionutrients Technical Manual" Tercera revisión revisada (2006) BD BIOSCENCE). Las peptonas para el cultivo celular se fabrican habitualmente mediante digestión enzimática de un conjunto de materiales de partida de base biológica: tejidos de animales, productos derivados de la leche, microorganismos o plantas.

30 [0005] El efecto general de las peptonas es un aumento del crecimiento celular y un incremento de la productividad, con la misma calidad de producto en comparación con el medio estándar (Jan et al., Cytotechnology 16:17-26 (1994); Heidemann et al., Cytotechnology 32:157-167 (2000); Sung et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:527-536 (2004)). Varios artículos han demostrado que las peptonas contienen materiales, tales como aminoácidos libres, oligopéptidos, sales de hierro, lípidos y elementos traza (Franck et al., Biotechnol. Prog. 16:688-692 (2000); Martone et al., Bioresour. Technol. 96:383-387 (2005)). Un estudio investigó las funciones potenciales de las peptonas y mostró que pueden tener un efecto nutricional (Heidemann et al., Cytotechnology 32:157-167 (2000). Además, Schlaeger, J. Immunol. Meth. 194:191-199 (1996), demostraron que un hidrolizado de proteínas particulares muestra propiedades contra la apoptosis.

35 [0006] A pesar de las numerosas investigaciones sobre los efectos de las peptonas en el cultivo celular, su mecanismo de acción aún es desconocido. Aunque las peptonas han demostrado ser beneficiosas en los procesos de cultivo celular, su uso también tiene muchas desventajas. En primer lugar, dado que algunas peptonas derivan de animales, se encuentran problemas similares que con el uso de suero. Además, las peptonas de otras fuentes también pueden ser una potencial fuente de agentes accidentales. En segundo lugar, la incertidumbre de los componentes "activos" en la peptona y su mecanismo de acción dificulta, si no imposibilita, tener una medición de la calidad en los lotes de peptonas utilizados en los procesos de fabricación de cultivos celulares. Finalmente, dado que los materiales de origen y los procesos en la fabricación de peptonas no están normalizados ni son generalmente intercambiables, las propias peptonas son por naturaleza una materia prima de origen único. Por lo tanto, existe la oportunidad de caracterizar mejor las peptonas a efectos de reducir o eliminar estas desventajas.

40 [0007] Por lo tanto, sería ventajoso entender la composición e identidad de los componentes activos en las peptonas a efectos de crear "medios definidos", que comprendan componentes activos bien especificados en concentraciones reproducibles bien definidas. Además se espera que la identificación de componentes activo de peptonas conduzca a un mejor entendimiento de la fisiología de células huésped y líneas celulares recombinantes al abrir una ventana al control del crecimiento y la muerte celular y un mejor control de la expresión de proteínas recombinantes.

45 [0008] Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para caracterizar composiciones de peptonas y para entender los mecanismos de sus efectos en los cultivos celulares.

50 [0009] La presente invención se basa en el fraccionamiento de una peptona derivada de animal, PP3, en componentes identificables y, mediante la aplicación de técnicas analíticas modernas que incluyen la espectrometría

de masas de alta resolución, el estudio de la naturaleza de estos compuestos. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el reconocimiento de que dipéptidos y tripéptidos que terminan en arginina juegan un papel en las actividades de inducción del crecimiento y el título de PP3.

5 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION**

[0010] La presente invención es tal como se establece en las reivindicaciones.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0011]

La figura 1 es la ilustración esquemática del fraccionamiento y análisis de PP3, tal como se describe en el ejemplo.

15 La figura 2 muestra los resultados de la cromatografía de fase inversa C18.

La figura 3 muestra los resultados de la cromatografía de la fracción que pasa por C18 (no unida). "Actividad específica relativa" se define como la actividad de un peso igual de la fracción dividida por la de PP3.

20 Las figuras 4A y 4B muestran que la actividad específica del material purificado por G-15 (fracciones F3-F7) se incrementó significativamente sobre la de PP3 con respecto a su capacidad de incrementar el título de proteína recombinante (figura 3A) y el recuento de células viables (VCC; figura 3B).

25 Figura 5. Análisis espectral de masas de la fracción de G-15. Panel superior: Rastreo MS de la fracción. Paneles inferiores: análisis ms/ms de m/z 403,2, 389,2 y 375,2, respectivamente.

Figura 6. Distribución de frecuencia de los péptidos en una biblioteca de tripéptidos *in silico* que terminan en R. Eje X: masa de tripéptidos; Eje Y: frecuencia a cada masa.

30 Figuras 7A y B. Efectos de PP3 y péptidos XXR sobre el VCC y el título de producto. A. VCC medido en el bioensayo en respuesta a la adición de concentraciones crecientes de PP3 (línea negra) o péptidos XXR (línea roja). B. Título de producto medido en el bioensayo en respuesta a la adición de concentraciones crecientes de PP3 (línea negra) o péptidos XXR (línea roja).

35 Figura 8. Secuencia de aminoácidos del componente 3 del polipéptido proteasa peptona (PP3) bovino (SEQ ID NO: 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 **A. Definiciones**

[0012] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que lo entendido habitualmente por un experto en la materia al que pertenece la invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª edición, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994) proporciona a un experto en la materia una guía general para muchos términos utilizados en la presente solicitud.

[0013] El término "peptona" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio e incluye derivados de proteínas solubles en agua obtenidas mediante la hidrólisis parcial de proteínas, y mezclas de los mismos, que incluyen, sin limitación, mezclas de hidrolizados derivados del tejido de mucosa de cerdo, ganado y otros animales, producidos mediante hidrólisis con enzimas proteolíticas, así como hidrolizados de varios tejidos de plantas. El término incluye específicamente, sin limitación, el componente 3 de peptona proteasa (PP3), también denominado lactoforina, que es una fosfoglicoproteína menor de 153 residuos (Sorensen y Sorensen, J. Dairy Res. 60:535-542 (1993)) hallada en la leche bovina (número de acceso en la base de datos SwissProt: P80195; No. de acceso de GenBank CAA58309), y proteínas homólogas caracterizadas por leche de otras especies, como el camello (Beg *et al.*, FEBS Lett. 216:270-274 (1987), llama (Cantisani *et al.*, J. Biochem. Biophys. Methods 21:227-236 (1990), oveja, y cabra (Sorensen *et al.*, J. Dairy Sci. 80:3176-3181(1997) y Lister *et al.*, J. Dairy Res. 81:2111-2115 (1998). Hasta ahora, no se ha hallado PP3 en leche humana. El PP3 está disponible de fuentes comerciales, tales como, por ejemplo, Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

60 [0014] El término "péptido" se utiliza en el presente documento para referirse a un compuesto que contiene dos o más aminoácidos en que el grupo carboxilo de un ácido está unido al grupo amino del otro mediante un enlace amida o "peptídico". La definición incluye específicamente péptidos formados de por lo menos dos residuos de aminoácidos y, en particular, dipéptidos y tripéptidos.

65 [0015] Por "proteína" se entiende una secuencia de aminoácidos para la que la longitud de cadena es suficiente para producir los niveles más elevados de estructura terciaria y/o cuaternaria. Habitualmente, la proteína del

presente documento tendrá un peso molecular de por lo menos 15-20 KD, preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 kD. Entre los ejemplos de proteínas comprendidas en la definición del presente documento se incluyen todas las proteínas de mamífero, en particular, proteínas terapéuticas y de diagnóstico, tales como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico y, en general, proteínas que contienen uno o más enlaces disulfuro, que incluyen polipéptidos multicadenas que comprenden uno o más enlaces disulfuro intercadenas y/o intracadenas.

[0016] El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" se refiere habitualmente a un aminoácido que tiene su definición reconocida en la técnica, tal como un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (pyro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val), aunque, según se desee, se pueden usar aminoácidos modificados, sintéticos o raros. De este modo, los aminoácidos modificados y no habituales listados en 37 CFR 1.822(b)(4) se incluyen en esta definición y se incorporan expresamente por referencia en el presente documento. Los aminoácidos se pueden subdividir en varios subgrupos. De este modo, los aminoácidos se pueden agrupar por tener una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); una cadena lateral cargada negativamente (por ejemplo, Asp, Glu); una cadena lateral cargada positivamente (por ejemplo, Arg, His, Lys); o una cadena lateral no cargada (por ejemplo, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, and Tyr). Los aminoácidos también se pueden agrupar en pequeños aminoácidos (Gly, Ala), aminoácidos nucleofílicos (Ser, His, Thr, Cys), aminoácidos hidrofóbicos (Val, Leu, Ile, Met, Pro), aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp, Asp, Glu), amidas (Asp, Glu), y aminoácidos básicos (Lys, Arg).

[0017] El término "actividad biológica" o "actividad biológica de peptona" en relación con los péptidos descritos en el presente documento se utiliza para referirse a cualquier actividad biológica conocida por ser mostrada por peptonas, que incluyen, sin limitación, la capacidad de inducir el crecimiento celular y/o la densidad celular y/o la viabilidad celular, y/o la eficacia de producción de un polipéptido heterólogo en cultivos de huéspedes recombinantes.

[0018] El término "cromatografía" se refiere al proceso por el cual un soluto de interés en una mezcla se separa de otros solutos en una mezcla como resultado de diferencias en las velocidades a las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil o en procesos de unión y elución.

[0019] El término "cromatografía de afinidad" y "cromatografía de afinidad de proteínas" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una técnica de separación de proteínas en que una proteína de interés o anticuerpo de interés se une de manera reversible y específica a un ligando bioespecífico. Preferiblemente, el ligando bioespecífico se une covalentemente a un material cromatográfico en fase sólida y es accesible a la proteína de interés en solución ya que la solución entra en contacto con el material cromatográfico en fase sólida. La proteína de interés (por ejemplo, anticuerpo, enzima o proteína receptora) mantiene su afinidad de unión específica para el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen de manera apreciable o específica al ligando. La unión de la proteína de interés al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o impurezas de proteínas pasen a través del medio cromatográfico mientras que la proteína de interés permanece unida de manera específica al ligando inmovilizado en el material en fase sólida. A continuación, la proteína de interés unida de manera específica se extrae en forma activa del ligando inmovilizado con un pH bajo, pH elevado, concentración elevada de sal, ligando competidor, y similares, y se pasa a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de proteínas contaminantes o impurezas de proteínas que anteriormente se dejaron pasar a través de la columna. Se puede utilizar cualquier componente como ligando para purificar su respectiva proteína de unión específica, por ejemplo, anticuerpo.

[0020] Los términos "cromatografía sin afinidad" y "purificación sin afinidad" se refieren a un proceso de purificación en el que no se utiliza la cromatografía de afinidad. La cromatografía sin afinidad incluye técnicas cromatográficas que dependen de interacciones no específicas entre una molécula de interés (tal como una proteína, por ejemplo, anticuerpo) y una matriz de fase sólida.

[0021] Una "resina de intercambio catiónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente y que, de este modo, tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa pasada sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede ser, por ejemplo, un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de Pharmacia) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de Pharmacia). Una "resina de intercambio iónico de modo mixto" se refiere a una fase sólida que está modificada covalentemente con grupos catiónicos, aniónicos e hidrofóbicos. Una resina de intercambio iónico de modo mixto disponible comercialmente es BAKERBOND ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) que contiene grupos de intercambio catiónico débiles, una concentración baja de grupos de intercambio aniónico, y ligandos hidrofóbicos unidos a una matriz de soporte de fase sólida de gel de sílice.

[0022] El término "resina de intercambio aniónico" se utiliza en el presente documento para referirse a una fase sólida que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a la misma. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (Farmacia).

B. Descripción detallada

Fraccionamiento y análisis de peptonas

[0023] La presente invención se basa en la identificación de fragmentos de peptonas activos utilizando una serie de técnicas cromatográficas y otras técnicas de separación.

[0024] El fraccionamiento de peptonas se puede realizar mediante técnicas conocidas en el sector, que incluyen una combinación de etapas cromatográficas. Un esquema típico para el fraccionamiento y análisis de la peptona PP3 se ilustra en la figura 1. La primera etapa en este esquema es HPLC de fase inversa (HPLC RP), que sirve para separar componentes en base a su carácter hidrofóbico. Los compuestos se unen a columnas de HPLC de fase inversa en fase móvil altamente acuosa elevada y se eluyen de las columnas de HPLC RP con una fase móvil altamente orgánica. De este modo, los péptidos se pueden separar utilizando esta técnica mediante el desarrollo de gradientes lineales o no lineales de un disolvente orgánico apropiado.

[0025] A continuación, la fracción del flujo que pasa de HPLC de fase inversa se puede someter a etapas de separación cromatográficas adicionales, tales como la cromatografía por exclusión de tamaño, tal como se muestra en la figura 1. La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) se refiere a la clasificación de moléculas de radios hidrodinámicos diferentes basados en el tiempo que estas moléculas están en una columna cromatográfica. La separación tiene lugar como resultado del mayor o menor tiempo que están las moléculas en el volumen de la fase estacionaria que forma la columna. Las moléculas con un radio hidrodinámico grande se eluyen pronto durante la separación; las moléculas con radios más pequeños se eluyen más tarde. Las resinas SEC son conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente de una serie de fabricantes. En los experimentos descritos en el ejemplo siguiente, se utilizó una columna de exclusión por tamaño SEPHADEX™ G15 (Amersham Biosciences), pero también son adecuadas otras columnas de exclusión por tamaño.

[0026] Si se desea, las peptonas se pueden subfraccionar mediante cromatografía de modo mixto. En esta técnica, la fase estacionaria contiene dos dominios de unión distintos en un único ligando cromatográfico. Los principios de separación acoplados habitualmente son el intercambio iónico y la cromatografía RP. La aplicación de la cromatografía de modo mixto normalmente es necesaria cuando la cromatografía de fase inversa (cromatografía RP) no consigue separar estructuralmente péptidos próximos. Actualmente, varios fabricantes ofrecen resinas de modo mixto comerciales que muestran diferentes especificidades, incluyendo la resina Hypercarb (Thermo Scientific), resina HLB Oasis® (Waters Corporation) y la resina SD-2 Dowex Optipore® (Dow Chemical Company). El sorbente Oasis es un copolímero de divinilbenceno y N-vinil pirrolidona. La composición equilibrada hidrofílica-lipofílica permite una retención intensa por RP y una mejor humectación de los poros en relación con las resinas RP tradicionales. Por lo tanto, se pueden adsorber los compuestos polares y no polares. El tamaño promedio de las partículas de Oasis es de 30 µm. La composición de la resina Optipore es similar a la de la resina Oasis (divinilbenceno con aminas terciarias) que le da propiedades de RP y absorbente de intercambio aniónico débil. El tamaño promedio de partículas es de varios cientos de µm.

[0027] En cada etapa de purificación, en las fracciones obtenidas se puede analizar la actividad biológica y/o se puede someter a varios métodos clínicos a efectos de determinar su composición.

Ensayos de actividad del péptido

[0028] Las fracciones de peptona generadas se pueden analizar utilizando bioensayos conocidos, incluyendo un bioensayo basado en células descrito en el ejemplo. Los ensayos de la actividad biológica de péptidos derivados de peptonas se basan habitualmente en la medición de varios parámetros de cultivo en cultivos celulares que incluyen el péptido en cuestión en el medio de cultivo. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, densidad celular, recuento de células viables, productividad de un polipéptido heterólogo (por ejemplo, anticuerpo) producido, etc. Dichos ensayos se describen, por ejemplo, en Franek et al., Biotechnol. Prog. 16:688-692 (2000); Franek et al., Biotechnol. Prog. 18:155-158 (2002); Franek et al., Biotechnol. Prog. 19:169-174 (2003); Franek et al., Biotechnol. Prog. 21:96-08 (2005).

Determinación de la composición de fracciones de peptonas

[0029] De este modo, las composiciones de peptonas y fracciones de peptonas se pueden analizar mediante espectrometría de masas (MS), RMN, ICPMS, análisis de aminoácidos y varias combinaciones de éstas y otras técnicas conocidas en el sector.

[0030] Los espectrómetros de masas consisten en una fuente de iones, un analizador de masas, un detector de

iones, una unidad de obtención de datos. En primer lugar, los péptidos se ionizan en la fuente de iones. A continuación, los péptidos ionizados se separan según su relación de masa-carga en el analizador de masas y se detectan los iones separados. La espectrometría de masas se ha utilizado ampliamente en el análisis de proteínas, especialmente desde la invención de los métodos de desorción-ionización láser asistida por matriz/tiempo de vuelo e ionización por electrospray (ESI). Existen varias versiones de analizadores de masas, incluyendo, por ejemplo, MALDI-TOF y triple o cuadrupolo-TOF, o analizador de masas de atrapamiento de iones acoplado a ESI. De este modo, por ejemplo, un espectrómetro de masas Q-Tof-2 utiliza un analizador de tiempo de vuelo ortogonal que permite la detección simultánea de iones a lo largo de todo el rango del espectro de masas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Chemusevich et al., J. Mass Spectrom. 36:849-865 (2001).

[0031] Si se desea, las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de péptidos y finalmente las proteínas de las que derivan se pueden determinar mediante técnicas conocidas en el sector, tales como ciertas variaciones de espectrometría de masas o degradación de Edman.

[0032] Aunque la presente invención se ilustra mediante fragmentos de péptidos identificados en los productos de degradación de una peptona particular, se espera que otras peptonas tendrán los componentes de péptidos con características estructurales y funcionales similares.

Bibliotecas combinatorias de péptidos

[0033] Las bibliotecas combinatorias de péptidos son conocidas en la técnica y se describen métodos para la generación y cribado de dichas bibliotecas en libros de texto estándar, tales como, por ejemplo, en Combinatorial Peptide Library Protocols (Methods in Molecular Biology), Shmuel Cabilly, ed., Humana Press Inc. 1998. También se describe una biblioteca de péptidos en Sloostra et al., Molecular Diversity, 1995, 1:87-96.

[0034] Las bibliotecas combinatorias de péptidos pueden estar en diferentes formatos. Por ejemplo, las denominadas bibliotecas de "un soporte un compuesto" ("one bead one compound") contienen miles de soportes, cada uno con múltiples copias de compuestos de la biblioteca individuales (Lam et al., Nature, 354, 82-84 (1991)). La biblioteca se criba por una actividad deseada y se aísla cualquier soporte o soportes activos. El compuesto activo unido al soporte o soportes identificados se caracteriza a continuación mediante métodos convencionales, tales como, por ejemplo, mediante degradación de Edman. Alternativamente, se puede utilizar una estrategia reductora. En otro método, la metodología de fijación posicional de Houghten (Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 1947-1951 (2004)), se genera un grupo de bibliotecas relacionadas antes del cribado. Cada biblioteca contiene compuestos con un residuo específico fijado como un bloque de construcción único y residuos totalmente aleatorios. Las bibliotecas diferentes tienen un bloque de construcción diferente en la posición fijada. El cribado de este grupo de bibliotecas, para una actividad deseada, permite la identificación directa del bloque de construcción óptimo en el residuo fijado. Este proceso se puede llevar a cabo secuencialmente, optimizando un residuo cada vez, o alternativamente todos los grupos de bibliotecas se pueden cribar de manera simultánea para permitir la identificación del compuesto de biblioteca óptimo directamente a partir de una única ronda de cribado.

[0035] Utilizando los péptidos descritos específicamente en el presente documento, se pueden utilizar las bibliotecas combinatorias de péptidos para identificar péptidos adicionales con características químicas y/o biológicas mejoradas.

Síntesis de péptidos

[0036] Los péptidos identificados tal como se describe en el presente documento se pueden sintetizar mediante métodos convencionales de síntesis de péptidos, tales como, por ejemplo, métodos de síntesis en fase sólida, que se pueden realizar en una variedad de formas, tales como, por ejemplo, utilizando los grupos protectores Fmoc (9H-fluoren-9-il-metoxi-carbonilo) o Boc (tert-butoxicarbonilo) para proteger los extremos N-terminales de los monómeros de aminoácidos utilizados en la síntesis. Los sintetizadores automatizados están disponibles comercialmente para ambas técnicas, pero la síntesis de péptidos en fase sólida también se puede realizar manualmente. Para más detalles, véase, por ejemplo, Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press. ISBN 0199630674; and Steward, J.M., Young, J.D. (1984). Solid phase peptide synthesis, 2a edición, Rockford: Pierce Chemical Company, 91. ISBN 0935940030.

Usos de los dipéptidos y tripéptidos

[0037] Los dipéptidos y tripéptidos descritos en el presente documento se pueden utilizar como componentes de medio de crecimiento utilizado para la producción de polipéptidos recombinantes, incluyendo anticuerpos.

[0038] Los polipéptidos recombinantes, tales como anticuerpos, se pueden producir en un conjunto de organismos huésped eucariotas y procariotas.

[0039] Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptido glicosilado, tal como anticuerpos, se pueden derivar de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e

insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y las correspondientes células huésped de insectos permisivos, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles de forma pública una variedad de cepas virales para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y se pueden utilizar dichos virus como el virus del presente documento particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar como huéspedes cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

[0040] Sin embargo, ha habido un mayor interés en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL, 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0041] Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos recombinantes, tales como anticuerpos, en células dp12.CHO, la producción de las cuales a partir de células CHO-K1 DUX-B11 se describe en EP307247. A su vez las células CHO-K1 DUX-B11 se obtuvieron de células CHO-K1 (ATCC No. CCL61 CHO-K1), siguiendo los métodos descritos en Simonsen, C. C., y Levinson, A. D., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499 and Urlaub G., y Chasin, L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77: 4216-4220. Además, son conocidas y se pueden utilizar otras líneas celulares CHO-K1 (dhfr-).

[0042] Las células huésped de mamífero utilizadas para producir péptidos, polipéptidos y proteínas se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPM1-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede utilizar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace (1979), Meth. in Enz. 58:44, Barnes y Sato (1980), Anal. Biochem. 102:255, patente de Estados Unidos No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; o 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; patente de Estados Unidos No. Re. 30,985; o patente de Estados Unidos No. 5,122,469, como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango de micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

[0043] Los péptidos descritos en el presente documento se pueden utilizar, de forma individual o en varias combinaciones, como componentes de cualquier medio de cultivo disponible comercialmente producido habitualmente.

[0044] La utilización de los péptidos descritos en el presente documento no se limita al cultivo de células huésped de mamíferos, o, en general, células huésped eucariotas. Los péptidos descritos en el presente documento también son útiles en cultivos celulares de organismos huésped procariotas. Las células huésped procariotas de ejemplo incluyen, sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceas, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. Licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. Aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. Coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas.

[0045] Los detalles adicionales de la presente invención se proporcionan en el siguiente ejemplo.

Ejemplo

Identificación molecular de tripéptidos que contienen arginina C-terminal biológicamente activos utilizando una biblioteca combinatoria

Materiales y métodos*Bioensayo TubeSpin*

[0046] Se diseñó el bioensayo TubeSpin para examinar los efectos de un aditivo del medio de cultivo celular en la proliferación y productividad celular (determinada mediante la densidad de células viables y concentración de anticuerpo producido, respectivamente) en un volumen de trabajo de 5 mililitros (ml) utilizando una densidad inicial de células viables de $1,5 \times 10^6$ células/ml.

[0047] Cada cultivo se preparó en un volumen de 7,15 ml de los que 5 ml se transfieren al tubo de ensayo. El tubo de ensayo es un tubo de centrifugación de 50 ml con un tapón especializado que contiene una membrana con un tamaño de poro de 0,2 micras para facilitar el flujo de gases. Los 2,15 ml que permanecían se utilizaron para medir la densidad de células viables (para confirmar que se había conseguido la densidad diana y que las células eran viables), osmolalidad y datos metabólicos (pH, glutamina, glutamato, lactato, amonio, sodio, potasio).

[0048] Dependiendo de la concentración y osmolalidad de partida del aditivo del medio deseado, se determinó una concentración diana para el aditivo. A partir de estos datos, se calculan el volumen del aditivo requerido, el volumen de cloruro de sodio requerido para conseguir la osmolalidad fisiológica en el cultivo final, y el volumen de agua necesaria para conseguir 7.15 ml. Utilizando estos valores, se ensambló una solución preparativa de aditivo de medio, cloruro de sodio y agua.

[0049] A continuación, a las células en Medio Esencial de Genentech Selectivo (GEM) se intercambié el medio a un medio de calidad de producción referido como GEM2. A continuación, las células en GEM2 se añadieron a cada tubo preparativo para conseguir las $1,5 \times 10^6$ células/ml indicadas en 7,15 ml. A continuación, se añadieron 5 ml a cada tubo de ensayo y se incubó a 37 grados centígrados durante 4,75 días.

[0050] Al final del periodo de incubación se midieron de nuevo la densidad, osmolalidad y perfil metabólico de células viables y se envió una muestra del cultivo de ensayo a un ensayo de cuantificación de anticuerpos separado para determinar su concentración.

Cromatografía preparativa de fase inversa C18

[0051] Se preparó una solución acuosa al 20% (p/v) de PP3 y se utilizó inmediatamente. Se empaquetó una columna de acero inoxidable de 5 x 5 con C18 preparativa de sílice Waters (tamaño de poro 125Å; tamaño de partícula 55-105 micras). La columna se preequilibró con 10 volúmenes de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,02% (p/v) en agua (tampón A) y se trabajó a un caudal de 60 ml/min. Se cargaron en la columna 200 ml de la solución de PP3 anterior. La monitorización del disolvente de control y el efluente de la columna se consiguió utilizando un sistema de cromatografía Akta controlado por software Unicorn (GE Healthcare). Después de la carga, la columna se lavó con tampón A hasta que la absorbancia del efluente a 280 nm alcanzó la línea base. A continuación, la columna se lavó con acetonitrilo (ACN) al 85% (v/v) que contenía TFA al 0,02% para eluir el material unido. Las fracciones se analizaron por la actividad biológica utilizando el bioensayo.

Cromatografía preparativa Sephadex G15

[0052] El material que pasaba por la columna C18 se concentró mediante evaporación rotatoria y se fraccionó adicionalmente en una columna Sephadex G-15 (7 cm diámetro x 50 cm longitud.). La columna se equilibró con agua desionizada antes de la carga y se cargó todo el flujo que pasó por la columna C18. Se recogieron las fracciones y se analizó la actividad utilizando el bioensayo descrito anteriormente.

Cromatografía analítica Hypercarb

[0053] Se analizaron muestras de fracciones activas utilizando una columna Hypercarb (grafito) (tamaño de partícula de 5 micras; dimensiones de la columna: 0,1 mm x 50 mm). Los tampones utilizados fueron el tampón A: TFA acuosa al 0,02%; y el tampón B: ACN al 85% + TFA al 0,02%. Se cargaron varios volúmenes (0-10 microlitros) en la columna que se preequilibró con tampón A y se eluyó con un gradiente lineal que iba hasta el 50% de tampón B durante 25 minutos. La columna trabajó a un caudal de 0,1 ml/min. El control del disolvente se consiguió con un HPLC Agilent 1100 equipado con un detector de red de diodos y un espectrómetro de masas de un cuadrupolo MSD. El sistema completo estaba bajo el control del software Agilent Chemstation.

Espectrometría de masas

[0054] Se realizó una espectrometría de masas de alta resolución utilizando un espectrómetro de masas Q-TOF (Waters Corporation) o un espectrómetro de masas Orbitrap (ThermoFinnigan). Los instrumentos operaron en modo de pulverización estática y se halló que la precisión de la masa era inferior a 5 ppm en ambos casos. Los espectros se utilizaron para obtener información precisa de la masa que se utilizó para correlacionarse con información de la

biblioteca de péptidos.

Bioinformática

- 5 [0055] Las bibliotecas in silico de dipéptidos y tripéptidos se construyeron con las precisiones de masa necesarias para correlacionarse con masas determinadas según se ha descrito anteriormente.

Síntesis de péptidos

- 10 [0056] Se creó una biblioteca de tripéptidos utilizando síntesis de péptidos de fase sólida Fmoc. La biblioteca se diseñó para contener todos los tripéptidos posibles que terminan en arginina (R), es decir, XXR.

Resultados

15 *Fraccionamiento de PP3*

- [0057] El esquema para el fraccionamiento y análisis se muestran en el diagrama de la figura 1.

20 *HPLC de fase inversa C18*

- [0058] El fraccionamiento inicial de PP3 se realizó utilizando HPLC de fase inversa. El cromatograma mostrado en la figura 2 es representativo del perfil de cromatografía de fase inversa de PP3. La mayoría de la masa (~70% del peso seco inicial) fluye a través de la columna al igual que la mayoría de la actividad biológica.
- 25 [0059] La fracción que pasa por la columna C18 se concentró y cargó en Sephadex G-15 para cromatografía por exclusión de tamaño, los resultados de los cuales se muestran en la figura 3.

- [0060] Las fracciones de la columna G15 se analizaron por su bioactividad. La actividad específica del material purificado con G15 (fracciones F3-F7) se incrementó significativamente sobre la de PP3 con respecto a su capacidad de incrementar el título de proteína recombinante (figura 4A) y el recuento de células viables (VCC; figura 4B).

Espectrometría de masas en el flujo de la fracción de G15

- 35 [0061] Las fracciones activas se analizaron utilizando espectrometría de masas a efectos de obtener información sobre la naturaleza molecular de los componentes activos. La figura 5 muestra un espectro de masas representativo obtenido de una muestra del flujo de G15 obtenido tal como se ha descrito anteriormente. El espectro contiene numerosos picos con masas inferiores a 500 Da. Una característica destacable de los espectros fue el hecho de que contenían muchos picos que diferían en la masa en 14 unidades de masa de una manera repetitiva. Además, se
- 40 identificó un pico a 175,1 m/z (figura 5) como arginina por la masa exacta y el posterior análisis de composición elemental. Además, el análisis de las tres masas (403,2, 389,2 y 375,2 m/z; marcadas con un recuadro) del espectro mostrado en la figura 5 utilizando la disociación inducida por colisión (CID) reveló patrones de fragmentación similares en el intervalo de masas inferiores a 200 Da. Esto incluía la identificación de un residuo de arginina intacto a 175,1 m/z de cada una de las tres masas. Además, en base a las mediciones exactas de las masas, estas
- 45 moléculas se identificaron como péptidos con las posibles siguientes identidades:

403,2 Da: EVR; DIR; DLR
389,2 Da: LTR; ITR
375,2 Da: SIR; SLR; TVR

- 50 [0062] El orden de los 2 primeros aminoácidos en las secuencias anteriores también se podría invertir. Existen varias posibilidades en cada masa debido al solapamiento en las combinaciones de aminoácidos individuales.

Creación de una biblioteca in silico de tripéptidos que contienen arginina

- 55 [0063] La estructura de repetición de 14 unidades de masa observada en los espectros de masa de fracciones de peptona y la presencia de arginina C-terminal en un grupo de estas moléculas sugería la presencia de una "biblioteca combinatoria" creada enzimáticamente de péptidos en PP3 que aparecen de los tejidos de animales. Para investigar más esta idea, se decidió crear una biblioteca in silico de tripéptidos que contienen arginina C-terminal. La biblioteca contiene 400 posibles péptidos y su composición y distribución de masas se representan en el gráfico
- 60 mostrado en la figura 6. La distribución de hecho se parece a las diferencias de las 14 unidades de masa observadas en las fracciones de peptona con picos repetitivos a intervalos de 14 Da.

Construcción y análisis de una biblioteca combinatoria de péptidos XXR

- 65 [0064] A efectos de explorar adicionalmente la idea de que los péptidos que contienen arginina C-terminal podrían

ser responsables de parte de la actividad observada en las fracciones de PP3, se produjo una biblioteca combinatoria de estas moléculas utilizando síntesis de péptidos en fase sólida (Fmoc). La biblioteca que contenía péptidos liofilizados se disolvió en agua desionizada y el pH de la solución se ajustó a ~ 7,0 con NaOH. A continuación, se desaló la solución utilizando una columna G-15. Se recogió una fracción de la biblioteca, se concentró mediante evaporación rotatoria y se analizó mediante espectrometría de masas y mediante bioensayo. El análisis espectral de masas reveló la presencia de dipéptidos y tripéptidos. Se creyó que los dipéptidos hallados en la mezcla aparecieron de una cierta proporción de reacciones de síntesis de péptidos fallidas.

[0065] La espectrometría de masas reveló la presencia de numerosos picos, los cuales se compararon con la biblioteca in silico referida anteriormente. La tabla 1 indica las masas, identidades e intensidades relativas de los péptidos hallados en esta fracción. Las asignaciones se basan en las mediciones precisas de las masas con errores inferiores a 5 ppm. Esta lista representa una lista parcial de todos los péptidos presentes en esta fracción.

Bioensayo de la fracción XXR de G-1262.1515 0.000429 1.637755 255

[0066] Los péptidos XXR preparados tal como se indica anteriormente se analizaron por la actividad en el bioensayo y se observó que tenían efectos positivos significativos en el crecimiento celular y el título.

Resumen

[0067] Los resultados presentados en este ejemplo muestran que la PP3 contiene moléculas activas con masas moleculares inferiores a 500 Da. Algunas de estas moléculas se identificaron como tripéptidos que contienen arginina C-terminal. Una biblioteca combinatoria de estos péptidos mostró una actividad biológica en un bioensayo de 6 días. Se concluyó que los tripéptidos que contienen arginina C-terminal son responsables, por lo menos en parte, de las actividades de inducción del crecimiento y título de PP3.

TABLA 1

Identificaciones de péptidos de XXR

Péptidos XXR identificados de la fracción bioactiva G15						
#	Asignación	m/z teórico	Error (abs)	Error (ppm)	Intensidad relativa	
1	DIR	403,2305	0,000408	1,011915	52	
2	DLR	403,2305	0,000408	1,011915	52	
3	EVR	403,2305	0,000408	1,011915	52	
4	IR	288,2036	0,000365	1,266195	45	
5	LR	288,2036	0,000365	1,266195	45	
6	DPR	387,1992	0,000308	0,795164	38	
7	PR	272,1723	0,000365	1,340232	38	
8	DR	290,1464	0,000344	1,185539	19	
9	TVR	375,2356	0,000293	0,781895	27	
10	EIR	417,2462	0,000458	1,097935	27	
11	ELR	417,2462	0,000458	1,097935	27	
12	VR	274,1879	0,000415	1,513006	25	
13	SR	262,1515	0,000429	1,637755	25	
14	AR	246,1566	0,000415	1,6847	24	
15	ER	304,1621	0,000294	0,966767	23	
16	INR	402,2465	0,000392	0,975621	23	
17	LNR	402,2465	0,000392	0,975621	23	
18	QVR	402,2465	0,000392	0,975621	23	
19	AVR	345,225	0,000229	0,662411	22	
20	GIR	345,225	0,000229	0,662411	22	
21	GLR	345,225	0,000229	0,662411	22	
22	MR	306,16	0,000387	1,262895	?	
23	IVR	387,272	0,000379	0,97839	20	
24	LVR	387,272	0,000379	0,97839	20	
25	ITR	389,2512	0,000343	0,882384	19	
26	LTR	389,2512	0,000343	0,882384	19	
26	DTR	391,1941	0,000323	0,824468	17	
28	ESR	391,1941	0,000323	0,824468	17	
29	GGR	289,1624	0,000328	1,1356642	17	
30	NR	289,1624	0,000328	1,135642	1	
31	DVR	389,2149	0,000358	0,9197	17	
32	IIR	401,2876	0,000429	1,069001	17	
33	ILR	401,2876	0,000429	1,069001	17	

ES 2 434 829 T3

34	LLR	401,2876	0,000429	1,069001	17
35	AIR	359,2407	0,000279	0,775956	16
36	ALR	359,2407	0,000279	0,775956	16
37	ADR	361,1836	0,000258	0,7138	16
38	EGR	361,1836	0,000258	0,7138	16
39	AGR	303,1781	0,000278	0,918467	16
40	QR	303,1781	0,000278	0,918467	15
41	GR	232,141	0,000465	2,001482	15
42	DQR	418,205	0,000422	1,008051	14
43	ENR	418,205	0,000422	1,008051	14
44	DMR	421,1869	0,00043	1,020357	13
45	EMR	435,2026	0,00048	1,102556	11
46	ASR	333,1886	0,000243	0,729836	11
47	GTR	333,1886	0,000243	0,729836	11
48	FPR	419,2407	-0,003021	-7,206469	11
49	IMR	419,2441	0,000351	0,836513	11
50	LMR	419,2441	0,000351	0,836513	11
51	IPR	385,2563	0,000329	0,853533	10
52	LPR	385,2563	0,000329	0,853533	10

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un péptido de fórmula

5 (X1)_nX2R

en el que X1 y X2 pueden ser idénticos o diferentes y representan independientemente cualquier aminoácido diferente de arginina;

n es 0 ó 1; y

10 R representa arginina,

en el que dicho péptido muestra una actividad biológica de peptona para inducir el crecimiento celular y/o la densidad celular y/o la viabilidad celular y/o la eficacia de producción de polipéptidos heterólogos en cultivos de huéspedes recombinantes.

15 2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho péptido se obtiene mediante el fraccionamiento de una peptona o se sintetiza químicamente.

3. Utilización, según la reivindicación 2, en la que dicha peptona que se fracciona es una peptona PP3 (componente 3 de la proteasa peptidona).

20 4. Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho péptido se selecciona entre los péptidos DIR, DLR, EVR, DPR, TVR, EIR, ELR, INR, LNR, QVR, AVR, GIR, GLR, IVR, LVR, ITR, LTR, DTR, ESR, GGR, DVR, IIR, ILR, LLR, AIR, ALR, ADR, EGR, AGR, DQR, ENR, DMR, EMR, ASR, GTR, IMR, FPR, LMR, IPR, LPR, IR, LR, PR, DR, VR, SR, AR, ER, MR, NR, QR, y GR.

25 5. Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho péptido es un tripéptido.

30 6. Utilización, según la reivindicación 5, en la que dicho tripéptido se selecciona entre los tripéptidos DIR, DLR, EVR, DPR, TVR, EIR, ELR, INR, LNR, QVR, AVR, GIR, GLR, IVR, LVR, ITR, LTR, DTR, ESR, GGR, DVR, IIR, ILR, LLR, AIR, ALR, ADR, EGR, AGR, DQR, ENR, DMR, EMR, ASR, GTR, IMR, FPR, LMR, IPR y LPR.

7. Utilización, según la reivindicación 1, en la que dicho péptido es un dipéptido.

35 8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que dicho dipéptido se selecciona entre los dipéptidos IR, LR, PR, DR, VR, SR, AR, ER, MR, NR, QR, y GR.

9. Biblioteca combinatoria de péptidos que consiste en los péptidos de la fórmula

40 (X1)_nX2R

en los que X1 y X2 pueden ser idénticos o diferentes y representan independientemente cualquier aminoácido diferente de arginina;

n es 0 ó 1; y

45 R representa arginina,

en los que por lo menos algunos de dichos péptidos muestran una actividad biológica de peptona para inducir el crecimiento celular y/o la densidad celular y/o la viabilidad celular y/o la eficacia de producción de polipéptidos heterólogos en cultivos de huéspedes recombinantes.

50

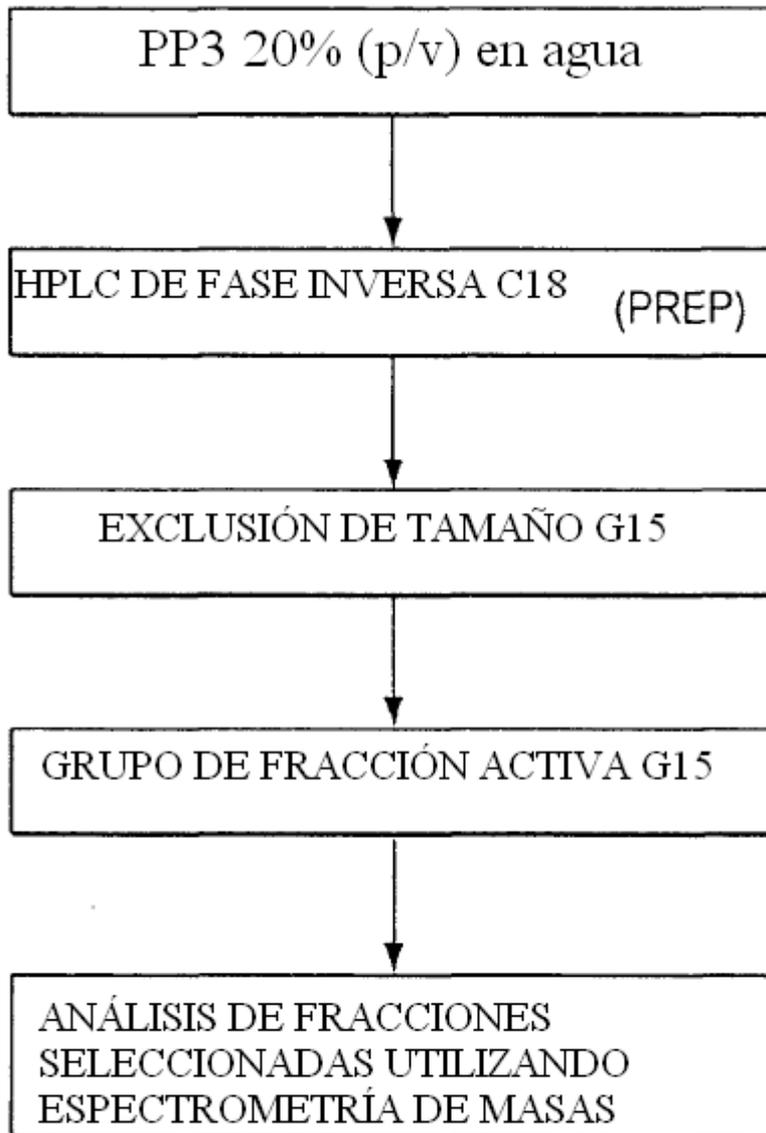


Figura 1

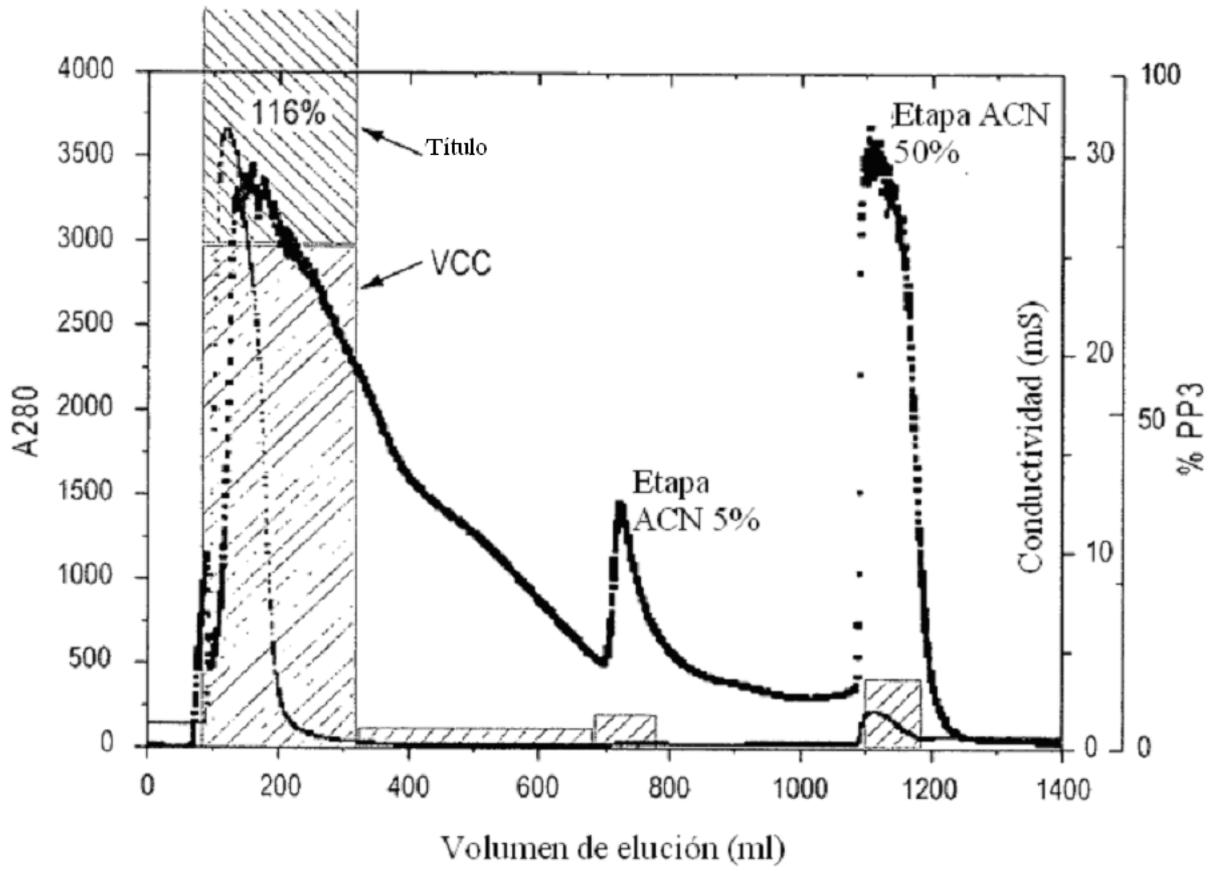


Figura 2

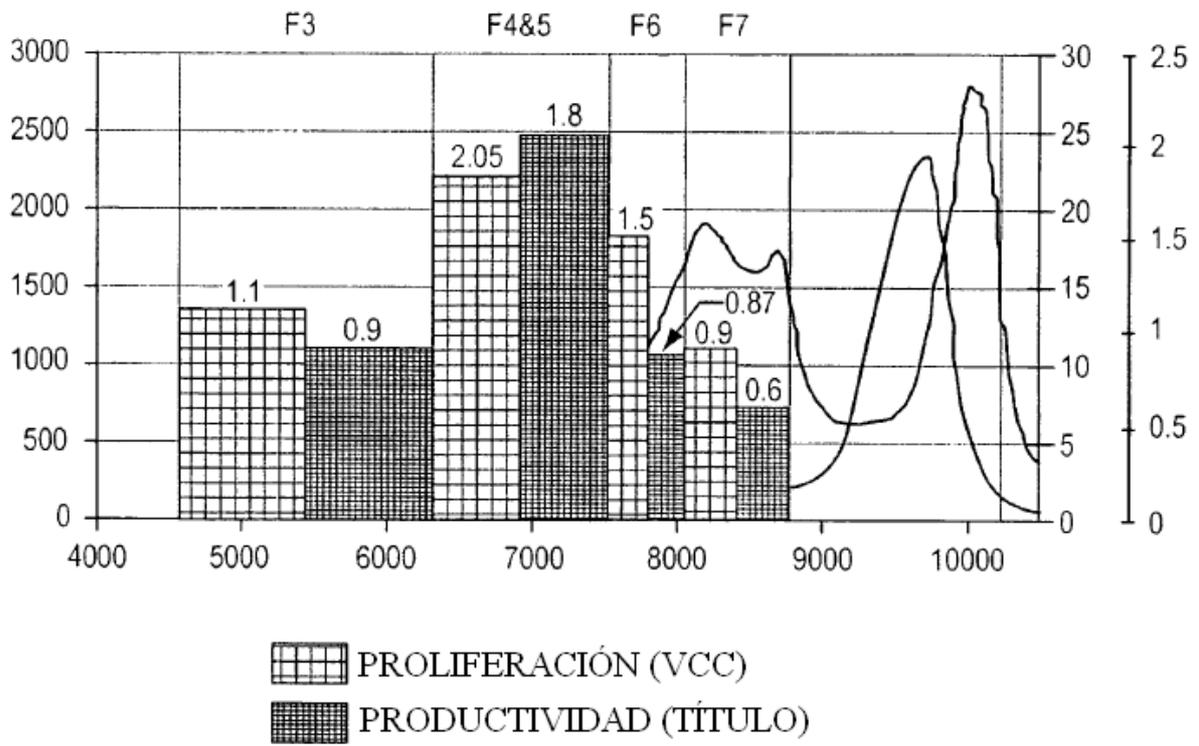


Figura 3

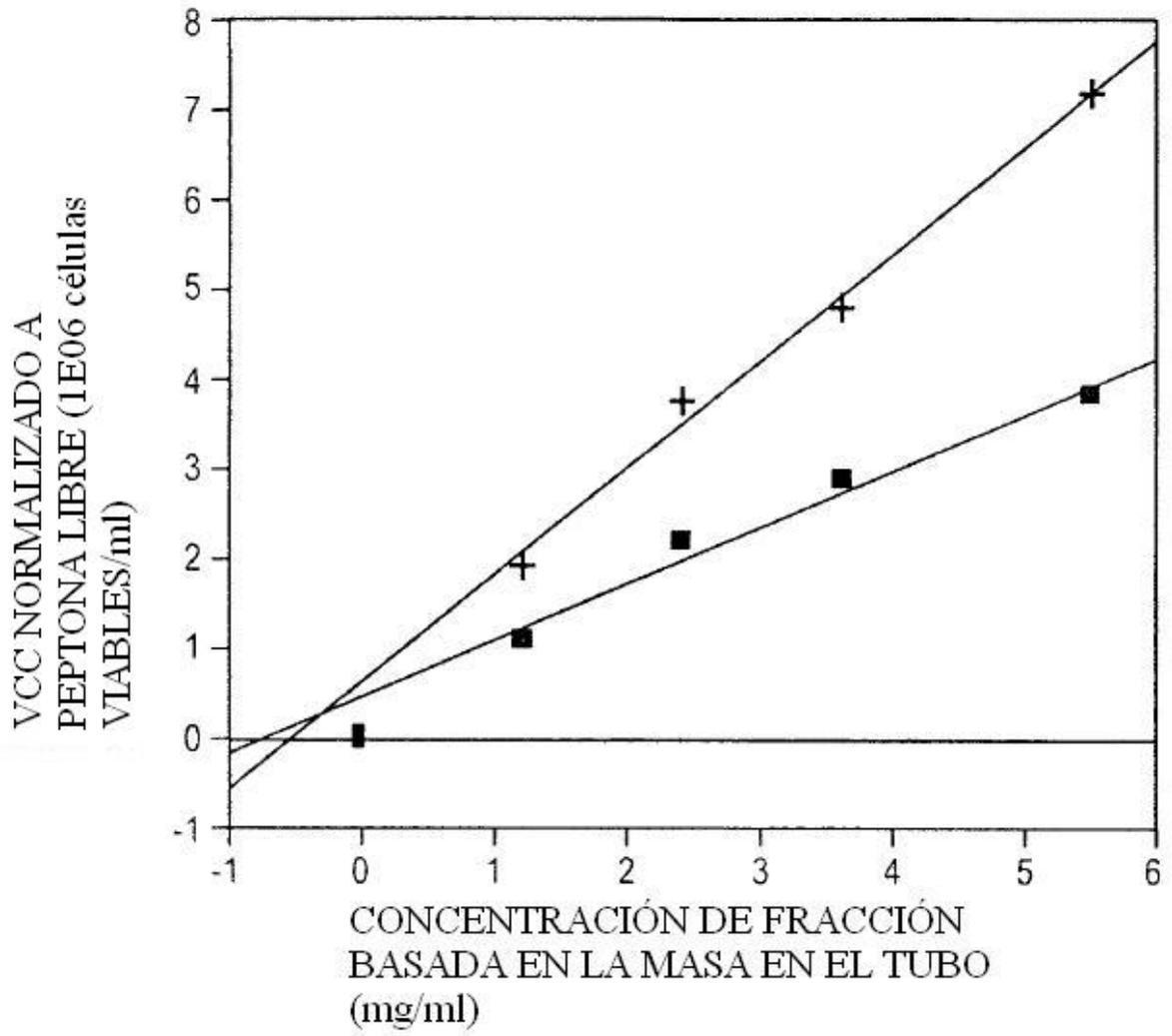


Figura 4A

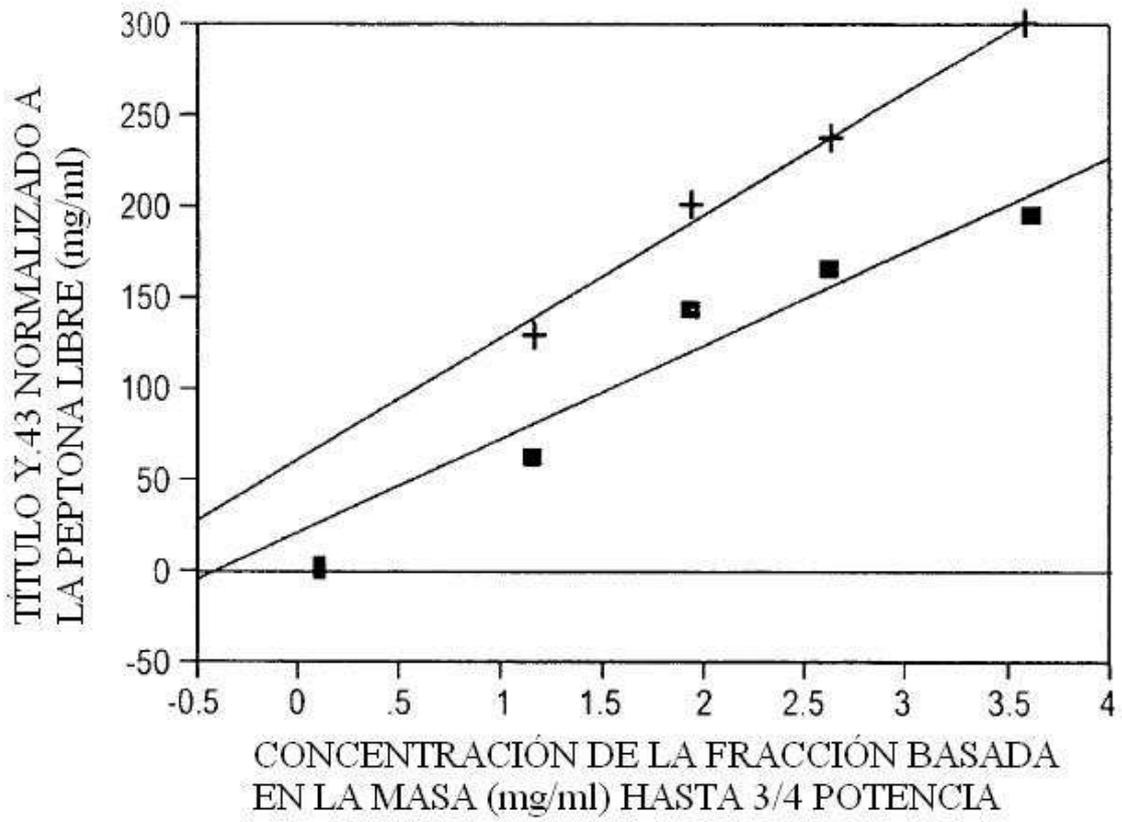


Figura 4B

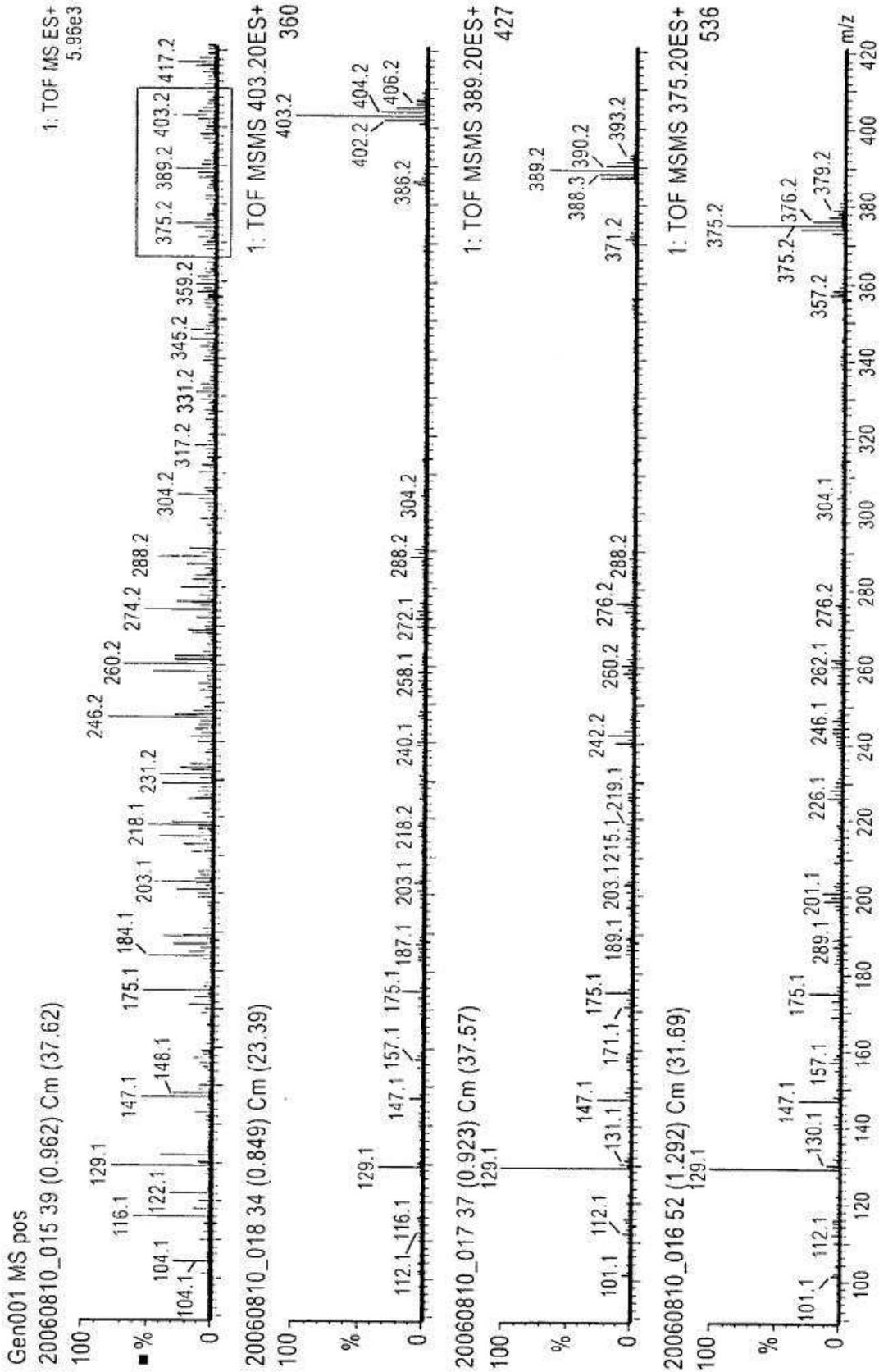


Figura 5

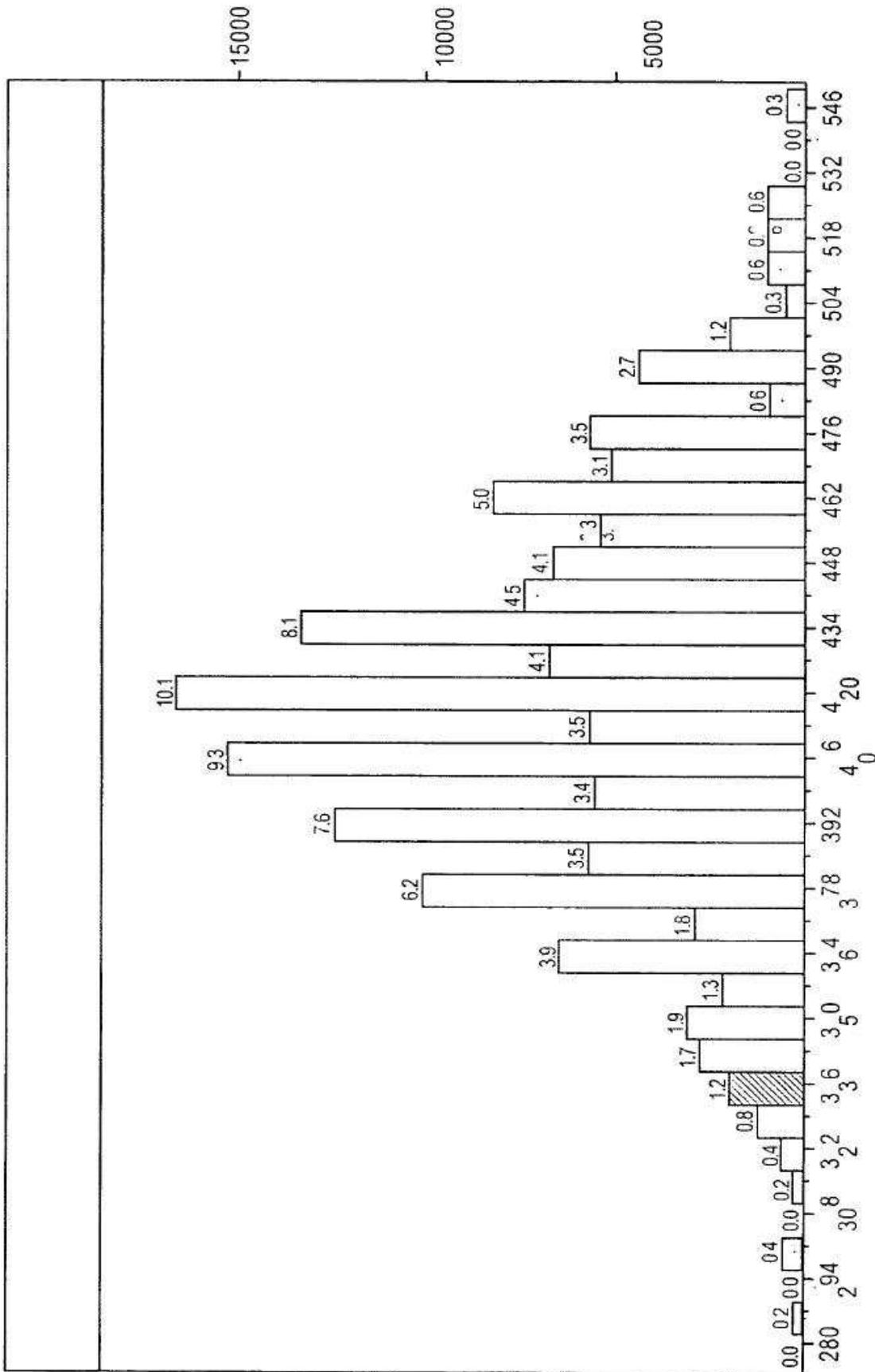


Figura 6

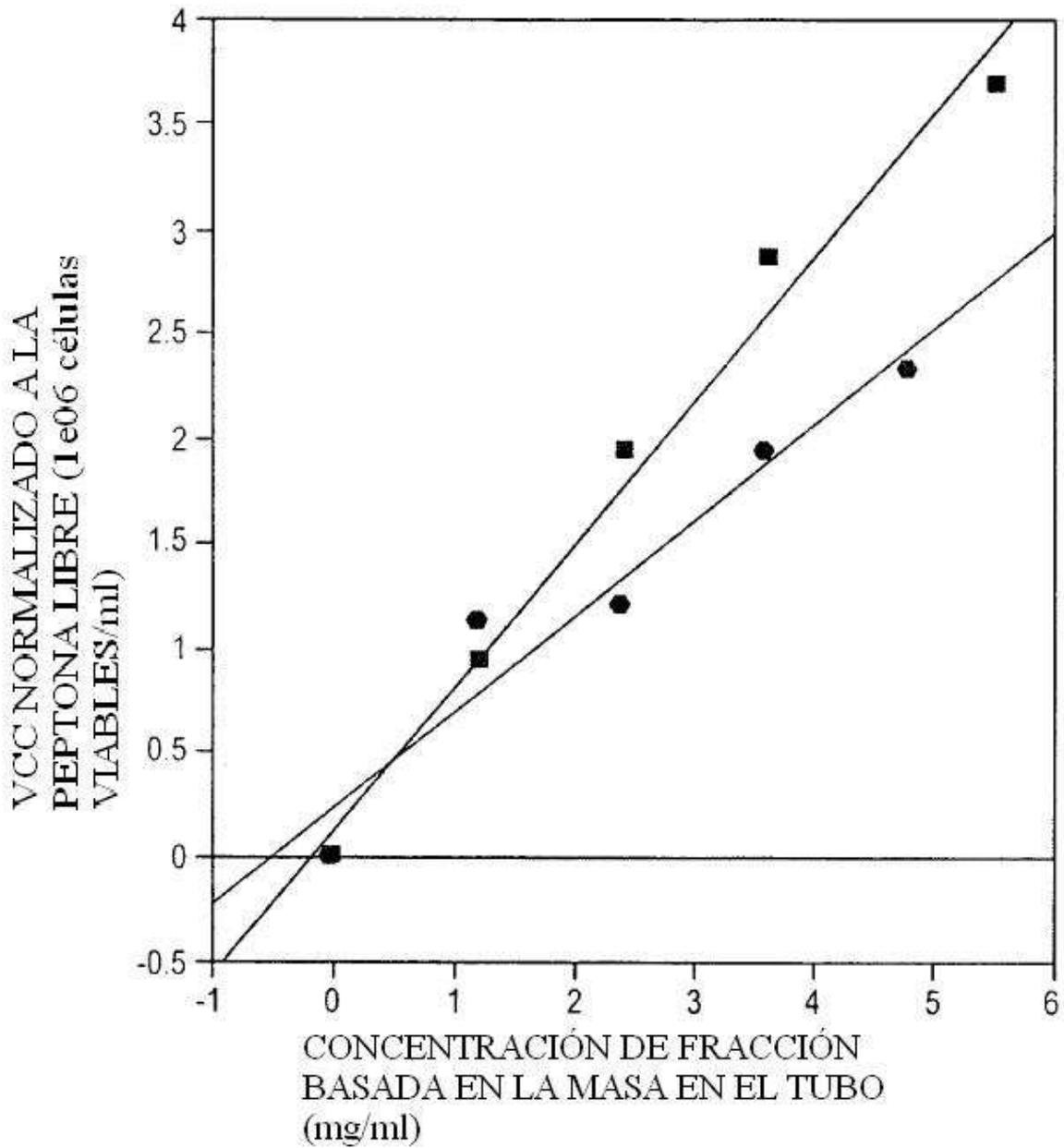


Figura 7A

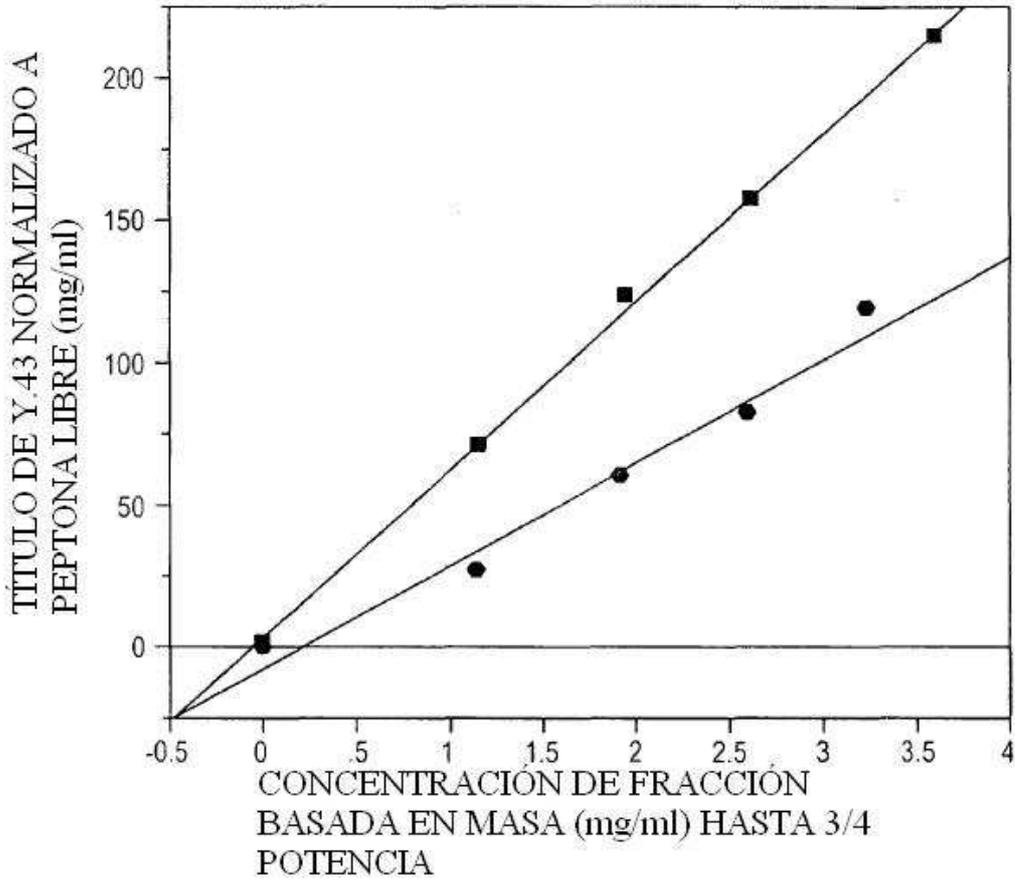


Figura 7B

MKFLCVLLLA SLAATSLAIL NKPEDETHLE AQPTDASAQF IRNLQISNED
 LSKEPSISRE DLISKEQIVI RSSRQPQSQN PKLPLSILKE KHLRNATLGS
 EETTEHTPSD ASTTEGKLMELGHKIMRNLE NTVKETIKYL KSLFSAFEV
 VKT (SEQ ID NO: 1)

Figura 8