

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 317**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/12** (2006.01)

**C07K 14/135** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2002 E 02740652 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1402050**

54 Título: **Producción recombinante de inhibidores de la fusión antivirales peptídicos**

30 Prioridad:

**15.06.2001 EP 01114497**

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

**22.12.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE, 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HOESS, EVA;  
MEIER, THOMAS;  
PESTLIN, GABRIELE;  
POPP, FRIEDRICH;  
REICHERT, KLAUS;  
SCHMUCK, RAINER;  
SCHNEIDINGER, BERND;  
SEIDEL, CHRISTOPH y  
TISCHER, WILHELM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 525 317 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

Producción recombinante de inhibidores de la fusión antivirales peptídicos

5 La invención está relacionada con los métodos para la producción recombinante de péptidos que inhiben la fusión de los virus con las membranas de las células diana. En particular, esta invención está relacionada con la producción recombinante de los inhibidores peptídicos de los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarampión (MEV), o virus respiratorio sincitial (RSV).

10 Antecedentes de la invención

La fusión de los virus con las membranas celulares es un paso esencial para la entrada en las células de los virus con envoltura, tales como el VIH-I, VIH-II, RSV, virus del sarampión, virus de la gripe, virus parainfluenza, virus de la hepatitis y el virus de Epstein-Barr. Después de haber entrado en la célula, la cascada de la replicación viral puede iniciarse resultando en la infección viral.

15 El VIH es un miembro del género lentivirus, que incluye retrovirus que poseen genomas complejos y partículas con el núcleo de la cápside en forma de cono. Otros ejemplos de lentivirus incluyen el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), el virus visna y el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE). Como en todos los retrovirus, el genoma del VIH está codificado en RNA, que se transcribe de forma reversa a DNA viral por la transcriptasa reversa viral (RT) al entrar en una nueva célula huésped. Los virus de la influenza y sus mecanismos de entrada a las células se describen en Bullough, PA, y otros, *Nature* 371 (1994) 37-43.; Carr, CM, y Kim, PS, *Cell* 73 (1993) 823-832; y Wilson, IA, et al., *Nature* 289 (1981) 366-373.

20 Todos los lentivirus están envueltos por una bicapa lipídica que se deriva de la membrana de la célula huésped. Las glucoproteínas de la superficie expuesta (SU, gp120) se anclan al virus a través de la interacción con una proteína transmembrana (TM, gp41). La bicapa lipídica también contiene varias proteínas de membrana celular derivadas de la célula huésped, incluidos los principales antígenos de histocompatibilidad, la actina y la ubiquitina (Arthur, LO, et al., *Science* 258 (1992) 1935-1938). Una cobertura matriz que comprende aproximadamente 2000 copias de la proteína matriz (MA, p17) recubre la superficie interna de la membrana viral, y una partícula del núcleo de la cápside cónica que comprende cerca de 2000 copias de la proteína de la cápside (CA, p24) se encuentra en el centro del virus. La partícula de la cápside encapsida dos copias del genoma viral no reordenado mediante corte y empalme, que se estabiliza como un complejo ribonucleoproteína con casi 2000 copias de la proteína de la nucleocápside (NC, p7), y también contiene tres enzimas esenciales codificadas por el virus: la proteasa (PR), la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN). Las partículas virales también empaquetan las proteínas accesorias, Nef, Vif y Vpr. Las tres proteínas accesorias adicionales que funcionan en la célula huésped, Rev, Tat y Vpu, no parecen estar empaquetadas.

40 En el caso del VIH, la entrada viral se asocia con las glucoproteínas de la superficie de la envoltura del VIH (Lawless, MK, et al, *Biochemistry* 35 (1996) 13.697 a 13.708; Y Turner, BG, y Summers, MF, *J. Mol Biol.* 285 (1999) 1-32). En el caso del VIH-I, esta proteína de superficie se sintetiza como una única proteína precursora de 160 kD, que se escinde mediante una proteasa celular en dos glicoproteínas gp-41 y gp-120. La gp-41 es una proteína transmembrana, y la gp-120 es una proteína extracelular que permanece asociada de forma no covalente con gp-41 en forma trimérica o multimérica (Hammar skjöld, M.-L., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 989 (1989) 269-280). El VIH tiene como diana los linfocitos CD4+ debido a que la proteína de superficie CD4 actúa como el receptor celular para el virus VIH-I. La entrada viral en las células depende de la unión de gp-120 a las moléculas receptoras CD4+ en las células, mientras que gp-41 ancla el complejo de glucoproteínas de la cubierta en la membrana viral y media la fusión de membranas (McDougal, JS, et al., *Science* 231 (1986) 382-385.; y Maddon, PJ, et al, *Cell* 47 (1986) 333-348).

50 La gp41 es la subunidad transmembrana que media la fusión de las membranas viral y celular. El núcleo del ectodominio de gp41 es un paquete de seis hélices compuesto de tres horquillas helicoidales, cada una de ellas formada por una hélice N emparejada con una hélice antiparalela C (Chan, DC, et al, *Cell* 89 (1997) 263-273; Weissenhorn, W., y otros, *Nature* 387 (1997) 426-430; Tan, K., et al, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94 (1997) 12.303-12.308). Las hélices N forman una bobina enrollada en espiral trimérica interior con tres hendiduras hidrófobas conservadas; y una hélice C se empaqueta en cada una de estas ranuras. Esta estructura probablemente corresponde al núcleo del estado de fusión activa de gp41. Según Chan, D.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95 (1998) 15.613-15.617, hay evidencia de que una cavidad prominente en la bobina espiral de la gp41 del VIH tipo 1 es una diana farmacológica atractiva.

60 Se asume que el mecanismo por el cual gp-41 media la fusión de la membrana puede implicar la formación de un trímero en la bobina en espiral, que se cree que dirige la transición del reposo al estado fusogénico, como se describe, por ejemplo, para la hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson, IA, y otros, *Nature* 289 (1981) 366-373.; Carr, CM, y Kim, PS, *Cell* 73 (1993) 823-832; Bullough, PA, et al, *Nature* 371 (1994) 37-43).

65

- Los péptidos C (péptidos correspondientes a la hélice C) de los virus con envoltura, tales como DP178 y C34, inhiben potentemente la fusión de membranas de ambas cepas adaptadas en el laboratorio y aislamientos primarios de VIH-1 (Malashkevich, VN, et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95 (1998) 9134-9139; Wild, CT, et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91 (1994) 9770-9774). Un ensayo clínico de fase I con el péptido C DP178 sugiere que tiene actividad antiviral *in vivo*, resultando en la reducción de la carga viral (Kilby, JM, et al., Nature Medicine 4 (1998) 1302-1307). Las características estructurales del núcleo de la gp41 sugieren que estos péptidos actúan a través de un mecanismo dominante negativo, en el que los péptidos C se unen a la bobina en espiral central de gp41 y dan lugar a su inactivación (Chan, DC, et al., Cell 93 (1998) 681-684).
- Dentro de cada interfaz de la bobina en espiral se encuentra una cavidad profunda, formada por un grupo de residuos en la bobina en espiral de la hélice N, que se ha propuesto como diana atractiva para el desarrollo de compuestos antivirales. Tres residuos de la hélice C (Trp-628, Trp-631, y Ile-635) se insertan en esta cavidad y realizan múltiples contactos hidrofóbicos. El análisis mutacional indica que dos de los residuos de la hélice N (Leu-Trp-568 y 571) que comprende esta cavidad son críticos para la actividad de fusión de membrana (Cao, J., et al., J. Virol. 67 (1993) 2747-2755). Por lo tanto, los compuestos que se unen con alta afinidad a esta cavidad y evitan el emparejamiento normal de las hélices N y C pueden ser inhibidores eficaces del VIH-1. Los residuos en la cavidad están altamente conservados en los diversos aislamientos de VIH-1. Por otra parte, un péptido C que contiene la región de unión o cavidad es mucho menos susceptible a la evolución de virus resistentes que DP 178, que carece de esta región (Rimsky, LT, et al., J. Virol. 72 (1998) 986-993). Estas observaciones sugieren que los ligandos de alta afinidad dirigidos a la superficie de la bobina en espiral altamente conservada, sobre todo a su cavidad, tendrán una amplia actividad contra diversos aislamientos de VIH y es menos probable que se escapen mutantes resistentes a los fármacos.
- Se han descrito estructuras fusogénicas de las proteínas de fusión de la envoltura de la gripe, el virus de la leucemia murina de Moloney y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (cit. En Chan, DC, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95 (1998), de 15613 hasta 15617), el virus respiratorio sincitial humano, Ebola, virus de la leucemia de células T humana y parainfluenza de los simios. Esto indica una estrecha relación entre las familias de los Orthomyxoviridae, paramyxoviridae, retroviridae y otros como filoviridae, en los que la entrada del virus en las células diana la permiten glucoproteínas transmembrana como la gp41 del VIH-1, la hemaglutinina de la gripe, la GP2 del Ébola y otros (Zhao, X., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97 (2000) 14172-14177).
- En el estado de la materia, se describen métodos para la preparación de inhibidores peptídicos (péptidos C) (véase, por ejemplo, Root, MJ, et al, Science 291 (2001) 884-888. Root et al. describen el péptido C37-H6 que se deriva de VIH-1. HXB2 contiene residuos 625-661. Se expresó de forma recombinante como segmento N40 con un enlazante GGR y una marca de histidina, se expresó en *E. coli* y se purificó a partir de la fracción soluble de los lisados bacterianos. Zhao, X., et al., describen en Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97 (2000) 14172-14177 un gen sintético de recRSV-1 (virus respiratorio sincitial humano) que codifica los residuos de 153 a 209, un enlazante rico en G, los residuos 476-524, la diana de escisión del Factor Xa y una marca de His. Chen, CH, et al., describen en J. Virol. 67 (1995) 3771 a 3777 la expresión recombinante del dominio extracelular de gp41 sintetizada como proteína de fusión, con los residuos 540-686 fusionados a MBP.
- Se conocen un número de inhibidores peptídicos, también diseñados como péptidos antifusogénicos, de tales eventos asociados a la fusión de membrana, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la transmisión retroviral a células no infectadas. Dichos péptidos se describen, por ejemplo, en Lambert, DM, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93 (1996) 2186-2191, en las patentes US nº 6.013.263, 6.017.536 y 6.020.459 y en los documentos WO 00/69902, WO 99/59615 y WO 96/40191. Otros péptidos que inhiben eventos asociados a la fusión se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 6.093.794, 6.060.065, 6.020.459, 6.017.536, 6.013.263, 5.464.933, 5.656.480 y en el documento WO 96/19495.
- Ejemplos de péptidos lineales derivados del ectodominio de la gp-41 del VIH-I que inhiben la fusión viral son DP-107 y DP-178. DP-107 es una porción de gp-41 cerca del péptido de fusión N-terminal y se ha demostrado que es helicoidal, y que oligomeriza fuertemente de manera consistente en formación de bobina en espiral (Gallaher, WR, et al., AIDS Res. Hum. Retrovirus 5 (1989) 431-440, Weissenhorn, W., et al., Nature 387 (1997) 426-430). DP-178 se deriva de la región C-terminal del ecto-dominio de GP-41. (Weissenhorn, W., et al., Nature 387 (1997) 426-430). Aunque sin estructura discernible en solución, este péptido y análogos limitados del mismo adoptan una estructura helicoidal, se unen a una ranura del trímero de la bobina en espiral N-terminal de gp41 y evitan así que gp41 se transforme al estado fusogénico (Judice, JK, et al ., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94 (1997) 13426-13430).
- Dichos péptidos de cadena corta por lo general se preparan mediante síntesis química. La síntesis química se describe, por ejemplo, en Mergler, M., et al, Tetrahedron Letters 29 (1988) 4005-4008 y de 4009 a 4012, Andersson, L., et al, Biopolymers 55 (2000) 227-250 y Jones, J.H., J. Pept. Sci. 6 (2000) 201-207. Otros métodos se describen en el documento WO 99/48513.
- Sin embargo, la síntesis química de péptidos sufre de varios inconvenientes. El más importante es la racemización, lo que resulta en una pureza óptica insuficiente. En química de péptidos, la racemización también implica epimerización en uno de varios centros de quiralidad. Si se produce sólo un 1% de racemización en una única etapa

de acoplamiento, entonces en 100 etapas de acoplamiento sólo se alcanzaría el 61% del péptido diana (Jakubke, HD, péptido, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1996), pág. 198). Es obvio que el número de impurezas aumenta con al aumentar la longitud de cadena y su eliminación es cada vez más difícil y costosa.

5 La síntesis química a gran escala está limitada por los altos costes y la falta de disponibilidad de derivados de aminoácidos protegidos como materiales de partida. Por un lado, estos materiales de partida deben utilizarse en exceso para que las reacciones sean completas, por otra parte, su uso debe equilibrarse por razones de coste, seguridad y aspectos medioambientales (Andersson et al., *Biopolymers* 55 (2000) 227-250).

10 Los péptidos también se pueden producir mediante tecnología de DNA recombinante. Mientras la producción recombinante de proteínas solubles de longitudes de cadena de más de 50 aminoácidos es conocida en el estado de la materia, la producción de péptidos con menos de 50 aminoácidos sufre de varios inconvenientes (Doebeli, H., et al, *Protein Expression and Purification* 12 (1998) 404-414). Estos péptidos de cadena corta o media por lo general no se expresan de forma estable. Son atacados por peptidasas intrínsecas y degradados. Esto puede ser el resultado de su pequeño tamaño o por falta de una estructura terciaria altamente ordenada (WO 00/31279). Otros autores han descrito que la producción recombinante de péptidos requiere una longitud de cadena mínimo de 60 a 15 80 aminoácidos para una expresión estable, y es además conocido que tales péptidos se producen como péptidos solubles y no como cuerpos de inclusión (véase, por ejemplo, van Heeke, G., et al, *Methods in Molecular Biology* 36 (1994) 245-260, eds BM Dunn y MW Pennington, Humana Press Inc., Totowa, NJ), y Goldberg et al., maximizando la expresión génica (1986), págs. 287-314, eds. Reznikoff, W., y Gold, L., Butterworks, Stoneham, MA). La producción recombinante de péptidos más cortos es especialmente poco exitosa porque si dichos péptidos se expresan en procariontas, permanecen solubles y son degradados inmediatamente por peptidasas procariontas. Para evitar este problema, de acuerdo con el conocimiento común, dichos péptidos se expresan como proteínas de fusión de gran tamaño (de más de 150 a 200 aminoácidos), en las que la cola de fusión, o bien hace que la proteína de fusión sea bastante soluble y evita la formación de cuerpos de inclusión, o bien la cola de fusión es una proteína que forma cuerpos de inclusión durante la expresión recombinante en procariontas, y por lo tanto la proteína de fusión que consta de dicha cola de fusión y el péptido corto deseado también forma cuerpos de inclusión durante la sobreexpresión en procariontas. Una gran desventaja de estos métodos es que el peso molecular de la cola de fusión es considerablemente más alto que el peso molecular del péptido deseado. Por lo tanto, el rendimiento del péptido deseado es muy bajo y el exceso de cola de fusión escindida tiene que separarse.

Lepage, P., et al., en *Analytical Biochemistry* 213 (1993) 40-48, describen métodos recombinantes para la producción de péptidos del VIH-1Rev. Los péptidos se expresan como proteínas de fusión con una inmunoglobulina sintética de tipo G (IgG) que se une a dominios de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los péptidos tienen una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos, mientras que la parte de unión a IgG tiene una longitud de aproximadamente 170 aminoácidos, de modo que la proteína de fusión expresada tiene una longitud total de alrededor de 190 aminoácidos. Esta proteína de fusión se expresa, se secreta en forma soluble al medio y se purifica mediante cromatografía de afinidad. Los autores informaron de que con este método puede llegar a producirse proteína recombinante en una cantidad de cientos de miligramos por litro de cultivo. Sin embargo, esta metodología está limitada debido al procesamiento alternativo dentro de la secuencia del péptido señal y a varias modificaciones post-traduccionales de las proteínas fusionadas, así como de los péptidos escindidos. Suponiendo un peso molecular medio de un aminoácido de 110 Daltons, los péptidos deseados tienen un peso molecular de aproximadamente 2000 a 5000 Daltons, mientras que la cola de fusión tiene una longitud de al menos 170 aminoácidos (aproximadamente 19.000 D), si se utiliza como cola como fusión los dominios de unión de IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, sólo del 10 al 25% de la proteína producida de forma recombinante es el péptido deseado.

El documento EP 0 673 948 describe la producción recombinante de un péptido gp41 como una proteína de fusión con  $\beta$ -galactosidasa utilizando el vector de expresión pSEM3 (Knapp, S., et al., *BioTechniques* 8 (1990) 280-281). Esta proteína de fusión contiene una gran parte del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, y codifica los 375 aminoácidos del extremo N-terminal y 23 codones adicionales de una secuencia polienlazante.

Otros ejemplos y métodos para la producción recombinante de péptidos pequeños a través de proteínas de fusión grandes en *E. coli* están descritos en Uhlen y Moks, "Gene fusions For Purposes of Expression, An Introduction" en *Methods in Enzymology* 185 (1990) 129-143, Academic Press. En lo que respecta a la producción mediante "cuerpos de inclusión", Uhlen y Moks se refieren a productos de fusión que incluyen parejas de fusión como trpE, CII y otra vez  $\beta$ -galactosidasa. Ningyi, L., et al., *Gaojishu Tongxun* 10 (2000) 28-31 describen la expresión recombinante del gen gag p24 en *E. coli*.

60 Por lo tanto, fue el objeto de la presente invención proporcionar un método que permita la producción recombinante de alto rendimiento de péptidos antifusogénicos mediante cuerpos de inclusión y que sea adecuado para la producción industrial a gran escala de tales péptidos.

Resumen de la invención

65 La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención proporciona por lo tanto un proceso para la producción de un péptido antifusogénico como un péptido de fusión de una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 70 aminoácidos en una célula huésped procariótica, que se caracteriza porque, en condiciones tales que se formen cuerpos de inclusión de dicho péptido de fusión,

a) en dicha célula huésped se expresa un ácido nucleico que codifica dicho péptido de fusión que consta de dicho péptido antifusogénico de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos unidos por el extremo N-terminal a un péptido adicional de una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 aminoácidos,

b) dicha célula huésped se cultiva;

c) dichos cuerpos de inclusión se forman, se recuperan y solubilizan;

d) dicho péptido de fusión se aísla,

en el que dicho péptido de fusión está representado por Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 y dicho péptido antifusogénico consiste en una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 7, 9 o 10, o de un fragmento de la misma.

Preferiblemente, dicho péptido antifusogénico se escinde del otro péptido mencionado durante o después de la solubilización de los cuerpos de inclusión.

Preferiblemente, el péptido antifusogénico es un fragmento de la hélice C de una subunidad transmembrana de una proteína de fusión de la cubierta de un virus del género lentivirus, como se expone en las reivindicaciones.

Dicho péptido adicional, si se expresa de forma recombinante en dicha célula huésped como un péptido no fusionado, no se encontraría en forma de cuerpos de inclusión ya que es muy corto.

En una realización preferida de la invención, el péptido adicional consiste de una primera y/ o segunda parte,

(a) en la que dicha primera parte es un tramo de 1 a 20 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos hidrófilos que influyen en el punto isoelectrico del péptido de fusión, y/ o dicha primera parte difiere significativamente del péptido antifusogénico con respecto a la solubilidad, las interacciones con las resinas de separación cromatográfica y/ o mejora el acceso de las proteasas de escisión (Polyak, SW, et al., Protein Eng. 10 (1997) 615-619) y

(b) en la que dicha segunda parte es una región enlazante peptídica escindible de 1 a 10 aminoácidos (véase, por ejemplo, la Tabla 3) y se encuentra adyacente al extremo N-terminal del péptido fusogénico y al C-terminal de la primera parte.

Si el péptido adicional consiste sólo en la primera o la segunda parte, dicha parte tiene una longitud de al menos 4 aminoácidos (incluyendo el codón de inicio codificado metionina), preferiblemente con el propósito de estabilizar durante la expresión del mRNA. Dichos 4 aminoácidos incluyen preferiblemente al menos una arginina.

En una realización adicional de la invención, el péptido antifusogénico contiene una glicina unida a su extremo C-terminal. Esta glicina es útil para la amidación enzimática en el extremo C-terminal.

En una realización preferida de la invención, la relación del peso molecular del péptido antifusogénico y el peso molecular del péptido adicional en el péptido de fusión es de 10:1 a 1:2.

Otras realizaciones preferidas de la invención comprenden un vector de expresión procariota que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido de fusión según la invención como se expone en las reivindicaciones y su uso para la producción recombinante de dichos péptidos como se expone en las reivindicaciones.

Las realizaciones preferidas de la invención comprenden una preparación de cuerpos de inclusión de un péptido de fusión según la invención como se expone en las reivindicaciones y los métodos para la producción de tales cuerpos de inclusión como se expone en las reivindicaciones.

Otra realización preferible de la invención comprende un ácido nucleico que codifica un péptido de fusión según la invención como se expone en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

Sorprendentemente, se descubrió que los péptidos antifusogénicos de cadena corta como el expuesto en las reivindicaciones (preferiblemente de una longitud de 10 a 50, más preferiblemente de una longitud de 10 a 40 aminoácidos) se pueden expresar con éxito como péptidos de fusión cortos de una longitud de hasta 70 aminoácidos en procariotas tales como E. coli a través de la vía de los cuerpos de inclusión, como se expone en las reivindicaciones.

Según la invención, un péptido de fusión como el expuesto en las reivindicaciones se sobreexpresa en procariontas bajo unas condiciones en las que se forman cuerpos de inclusión de proteínas insolubles como los expuestos en las reivindicaciones. Los cuerpos de inclusión se encuentran en el citoplasma si se utiliza un vector de expresión que no contiene una secuencia señal, que de otro modo permitiría la secreción de la proteína soluble al periplasma o al medio. Estos cuerpos de inclusión se separan de otros componentes celulares, por ejemplo mediante centrifugación después de la lisis celular. Los cuerpos de inclusión se solubilizan mediante agentes desnaturizantes tales como clorhidrato de guanidina, urea, sustancias tales como la arginina, o bases fuertes tales como KOH o NaOH. Después de la solubilización, tales proteínas por lo general tienen que replegarse mediante dilución o por diálisis. Como el péptido de fusión producido de acuerdo con el método de la invención es un péptido de cadena corta sin puentes disulfuro, la renaturalización no es necesaria. Después de la solubilización, simplemente se modifican las condiciones de la solución, como el pH, etc., de tal forma que la escisión del péptido adicional es posible, y si es necesario se realiza la escisión. El péptido o péptido antifusogénico de fusión puede entonces recuperarse de esta solución de manera simple, por ejemplo mediante cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de iones o cromatografía de fase reversa.

Como se utiliza aquí, "antifusogénico" y "anti-fusión de la membrana" se refiere a la capacidad de un péptido para inhibir o reducir el nivel de los eventos de fusión entre dos o más estructuras, por ejemplo, las membranas celulares o envolturas virales o pili, en relación con el nivel de fusión de membranas que se produce entre las estructuras en ausencia del péptido. Ejemplos de ello son los inhibidores peptídicos de los lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus respiratorio sincitial (RSV), virus de la parainfluenza humano (VPH), el virus del sarampión (MEV) y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). Tales péptidos antifusogénicos se derivan de la hélice C de una subunidad transmembrana de una proteína de fusión de la cubierta de un virus del género lentivirus y se unen a la bobina en espiral de la subunidad transmembrana del virus respectivo.

Son especialmente preferibles los péptidos antifusogénicos del VIH-1. La Tabla 1 describe ejemplos de péptidos antifusogénicos del VIH-1 derivados del péptido C de gp41. Los péptidos antifusogénicos como los expuestos en las reivindicaciones y los fragmentos de los mismos son particularmente útiles en la invención.

Tabla 1

Nombr e*	Nombre	Secuencia de aminoácidos (código de una letra)	Id. de Sec. N°:
T-1249	T1357 <sup>1)</sup>	WQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF	7
T-20, DP178	T680 <sup>2)</sup>	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	8
T-118	RSV118 <sup>3)</sup>	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDPELLHNVNAGKST	9
T-257	MV257 <sup>3)</sup>	LHRIDLGPPISLERLDVGTNLGNIAKLEDAKELL	10

\* para el péptido amidado en el extremo C-terminal y/o acetilado en N-terminal; T-20 (sinónimo de DP178) y T-1249 son de virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), T-118 es del virus respiratorio sincitial (RSV) y T-257 es del virus del sarampión (MV)

1) WO 99/59615  
 2) Rimsky, LT, et al., J. Virol. 72 (1998) 986-993  
 3) Lambert, D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 2186-2191

El péptido adicional del péptido de fusión de acuerdo con la invención es un péptido que se añade en el extremo N-terminal al péptido antifusogénico no con fines de mejorar la formación de cuerpos de inclusión. Su propósito es, por ejemplo, mejorar la estabilización de la expresión del mRNA, su purificación (por ejemplo, una cola de His; véase, por ejemplo, Zhang, J.-H., et al, Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue 36 (4) (2000). 515-517) o para permitir su posterior modificación en el extremo N-terminal, como una acetilación o PEGilación.

El péptido adicional del péptido de fusión de acuerdo con la invención es un tramo peptídico corto que consiste en al menos cuatro aminoácidos (metionina y otros tres aminoácidos con fines de estabilización de la escisión del mRNA y/o de expresión) a aproximadamente 30 aminoácidos, preferiblemente a aproximadamente 20 aminoácidos (respecto al nivel de codones de ácido nucleico). La longitud del péptido adicional no es crítica para la invención siempre que este péptido sea un péptido que se forme en forma soluble en el citoplasma durante la expresión recombinante en procariontas en condiciones en las que proteínas grandes tales como inmunoglobulinas, estreptavidina o el activador de plasminógeno de tipo tisular se produzcan como cuerpos de inclusión. Sin embargo, es preferible que el péptido adicional sea muy corto para mejorar el rendimiento del péptido antifusogénico (si la relación de la longitud del péptido adicional con la del péptido antifusogénico es de 3:1, la cantidad de péptido antifusogénico en relación con la cantidad del péptido de fusión recuperada es aproximadamente un 50% menor que si la relación es de 1:1, si se produce la misma cantidad de péptido de fusión). La longitud del péptido adicional se selecciona de tal manera que la longitud total del péptido de fusión no exceda de aproximadamente 70 aminoácidos, preferiblemente 50 y lo más preferiblemente 40 aminoácidos, con el fin de obtener rendimientos aceptables de los péptidos antifusogénicos. Por lo tanto, es especialmente preferible que el péptido adicional consista sólo en un sitio de escisión apropiado, de algunos aminoácidos para mejorar la expresión y la solubilidad del péptido de fusión,

facilitando el proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión o para mejorar el acceso de las proteasas de escisión (evitando el impedimento estérico) y/ o de algunos aminoácidos, tales como una cola de His con fines en la purificación (Hengen, P., Trends Biochem. Sci. 20 (1995) 285-286) y la metionina necesaria y codificada por el codón de inicio.

El péptido adicional es un péptido de cadena corta que, si se sobreexpresa solo en procariontes tales como E. coli y sin una secuencia señal, no se encontraría en forma de cuerpos de inclusión, sino que permanece soluble en el citoplasma o se degrada rápidamente en el citoplasma. Tales proteínas no forman una estructura terciaria desnaturalizada fija, por lo tanto, no pueden formar una estructura terciaria fija que sea poco soluble, por lo tanto permanecen solubles y se degradarían mediante las proteasas de E. coli si se expresan.

El péptido adicional del péptido de fusión de acuerdo con la invención consiste preferiblemente en aminoácidos que no forman una conformación terciaria fija que podrían obstaculizar estéricamente el acceso del agente de escisión al sitio de escisión situado entre el péptido fusogénico y el péptido adicional. Por esta razón, el péptido adicional está preferiblemente libre de residuos de cisteína. La cisteína contiene un grupo sulfhidrilo o tiol que es altamente reactivo y puede formar enlaces disulfuro. La presencia de cisteína puede ir en contra de la ausencia de conformación secundaria o terciaria fija deseada para el péptido adicional y por lo tanto se evita su uso.

En una realización preferida de la presente invención, el tramo de péptido unido adicionalmente al extremo N-terminal contiene una secuencia en su extremo C-terminal, que es escindible fácilmente mediante medios enzimáticos o químicos.

El péptido adicional del péptido de fusión de acuerdo con la invención se usa en el péptido de fusión también preferentemente para la protección del extremo N-terminal del péptido antifusogénico durante su expresión, solubilización, purificación y modificación del péptido. Tales péptidos de fusión son especialmente valiosos en un proceso para la producción de péptidos antifusogénicos modificados en el extremo N-terminal. Tal método implica obtener el polipéptido recombinante como un péptido de fusión, cuya la parte de fusión protege el extremo N-terminal. El péptido de fusión recombinante puede hacerse reaccionar con hasta tres agentes protectores químicos para proteger selectivamente los grupos reactivos de las cadenas laterales y de ese modo evitar que se modifiquen los grupos de las cadenas laterales. A continuación, el péptido de fusión se escinde, con al menos un reactivo de escisión, entre el péptido y la parte de fusión para formar un grupo reactivo aminoácido terminal no protegido. El grupo reactivo aminoácido terminal no protegido es modificado con al menos un agente modificador químico, tal como el anhídrido acético o el éster de N-hidroxisuccinimida acético para la acetilación en N-terminal. Las cadenas laterales se desprotegen a continuación para formar un péptido modificado en el extremo N-terminal. Tales métodos se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/01451, la patente estadounidense N° 5.635.371 y la patente estadounidense N° 5.656.456.

La parte del péptido adicional tiene preferiblemente una estructura tal que facilita la purificación del péptido de fusión. El péptido adicional contiene preferiblemente para este propósito una "cola de afinidad" (véase Pandjaitan, B., et al., Gene 237 (1999) 333-342), tales como una polihistidina (alrededor de 6 residuos de His) o similares.

Es preferible seleccionar el péptido adicional de manera tal que su punto isoeléctrico (PI) difiera del PI del péptido antifusogénico para facilitar la expresión y separación de los fragmentos después de la escisión. La Tabla 2 muestra los PI de diferentes péptidos de fusión y el PI de péptidos antifusogénicos sin fusión T680 y T1357 (nomenclatura según el documento WO 96/40191 y WO 99/59615). Preferiblemente, el PI del péptido adicional y la porción antifusogénica del péptido de fusión difieren en aproximadamente una unidad de pH, preferiblemente entre aproximadamente 1 y 2 unidades de pH. Tal cambio de PI puede conseguirse preferiblemente mediante incorporación de aminoácidos básicos y/ o histidinas en el péptido adicional.

Tabla 2

Cálculo de los puntos isoeléctricos de los péptidos antifusogénicos		
Id. de Sec N°:	Secuencia <sup>2)</sup>	Calculado
8	T680	4,13
15	M-HHHHHH-IEGR-T680-G	6,13
-	T1249	5,1 <sup>1)</sup>
7	T1357	4,53
14	M-HHHHHH-IEGR-T1357-G	6,23
2	MRGS-HHHHHH-AIVD-IEGR-T1357-G	6,23
1) determinado experimentalmente.		
2) aminoácidos en código de una letra; las partes inversas son los nombres de los péptidos.		

En una realización adicional preferible de la invención, el péptido antifusogénico contiene una glicina en su extremo C-terminal. Esta glicina es útil para la posterior amidación enzimática en C-terminal (Bradbury, AF, y Smyth, DG, Trends Biochem. Sci. 16 (1991) 112-115).

Los péptidos de fusión especialmente preferibles de acuerdo con la invención son (aminoácidos en código estándar de una letra):

- 5 MRGS-HHHHHH-AIDV-IEGR-T1357-G, (Id. de Sec. N°: 2)  
 MRGS-HHHHHH-AIDV-IEGR- RSV118-G (Id. de Sec. N°: 11)  
 MRGS-HHHHHH-AIDV-IEGR-MV257-G (Id. de Sec. N°: 12)  
 M-HHHHHH-IEGR-T1357-G (Id. de Sec. N°: 14)

- 10 y dichos péptidos de fusión sin la cola de poli-HIS (HIS 6), o con los primeros cuatro aminoácidos del Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 como péptido adicional en los péptidos de fusión.

Anotación: Las partes inversas son nombres de péptidos, y por lo tanto las letras incluidas en estas partes no constituyen códigos de una letra para los aminoácidos.

- 15 Existen un gran número de publicaciones que describen la producción recombinante de proteínas en procariotas a través de la ruta de cuerpos de inclusión. Ejemplos de tales publicaciones son Misawa, S., et al, *Biopolymers* 51 (1999) 297-307.; Lilie, H., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 497-501; Hockney, R. C., *Trends Biotechnol.* 12 (1994) 456-463.

- 20 Los péptidos de fusión de acuerdo con la invención se sobreexpresan en procariotas. La sobreexpresión sin péptido señal conduce a la formación de cuerpos de inclusión. La metionina codificada por el codón de inicio que se menciona en los ejemplos anteriores puede escindirse durante el procesado posterior. Los métodos generales para la sobreexpresión de proteínas en procariotas son bien conocidos desde hace mucho tiempo en el estado de la materia. Ejemplos de publicaciones en el area son Skelly, JV, et al., *Methods Mol. Biol.* 56 (1996) 23-53 y Das, A., *Methods Enzymol.* 182 (1990) 93-112.

- 25 La sobreexpresión en procariotas significa una expresión que utiliza casetes de expresión optimizados con promotores como el promotor tac o lac (EP-B 0 067 540). Por lo general, esto puede realizarse mediante el uso de vectores que contienen promotores inducibles por químicos o promotores inducibles a través de cambios en la temperatura. Uno de los promotores útiles para *E. coli* es el promotor  $\lambda$ pL sensible a la temperatura (véase el documento EP-B 0 041 767). Un promotor más eficiente es el promotor tac (véase la patente estadounidense N° 4.551.433). Tales señales de regulación fuertes para procariotas tales como *E.coli* generalmente se originan a partir de bacteriófagos que atacan a las bacterias (ver Lanzer, M., et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) desde 8973 hasta 8977, Knaus, R., y Bujard, H., *EMBO Journal* 7 (1988) 2919-2923, para el promotor  $\lambda$ T7, y Studier FW, et al, *Methods Enzymol* 185 (1990) 60-89); para el promotor T5 EP 0 186 069).

- 30 Mediante el uso de tales sistemas de expresión en células procarióticas superproductoras, los péptidos de fusión de acuerdo con la invención se producen a niveles que comprenden al menos 10% del total de la proteína expresada de la célula, típicamente un 30-40%, y en ocasiones hasta un 50%.

- 35 Tal como se utiliza aquí, "cuerpos de inclusión" (IB) se refiere a una forma insoluble de polipéptidos producidos de forma recombinante después de la sobreexpresión del ácido nucleico que lo codifica en procariotas. Este fenómeno es ampliamente conocido en el estado de la materia y se revisa, por ejemplo, en Misawa S. y Kumagai, I., *Biopolymers* 51 (1999) 297-307); Guise, A.D., et al., *Mol. Biotechnol.* 6 (1996) 53-64; y Hockney et al., *Trends Biotechnol.* 12 (1994) 456-463.

- 40 La solubilización de los cuerpos de inclusión se realiza preferiblemente mediante la adición de agentes desnaturizantes tales como urea, clorhidrato de guanidina o soluciones alcalinas de KOH o NaOH (Guise, AD, et al, *Mol Biotechnol* 6 (1996) 53-64, Fischer , B., et al., *Arzneimittelforschung* 42 (1992) 1512-1515).

- 45 Los péptidos de fusión de acuerdo con la invención pueden ser escindidos enzimáticamente después de la solubilización con una proteasa de escisión específica (proteasa de restricción). La proteinasa se selecciona tomando en consideración la secuencia de aminoácidos del péptido antifusogénico a producir. Se debe tener la precaución de que, si es posible, la secuencia de reconocimiento/ escisión de la proteinasa de restricción no se encuentre en el péptido antifusogénico, y preferiblemente tampoco en el péptido adicional, es decir, sólo debe ocurrir una vez en la región de escisión (región de enlace). Las endoproteinasas de escisión específicas adecuadas son, por ejemplo, el factor Xa, trombina, subtilisina, BTN variante/ peptidasa proteasa de ubiquitina, renina, colagenasa, tripsina, quimiotripsina, endoproteinasa Lys-C, calicreína (Carter, P.: en: Ladisch, MR; Willson , RC; Painton, CC; Builder, SE, eds, *Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes*; ACS Symposium Series N° 427, American Chemical Society, págs. 181-193 (1990)), proteinasa TEV (Parks, TD, et al., *Anal. Biochem.*, 216 (1994) 413-417), proteasa IgA (Pohlner, J., et al., *Nature* 325 (1987) 458-462), proteinasa Kex2p (EP-A 0 467 839) o proteinasa V8 de *S. aureus*.

- 60 Además de estar libre de cisteína, la secuencia del péptido adicional preferiblemente puede utilizar otras estrategias de diseño que promuevan la escisión eficaz en el entorno de escisión preseleccionado. En particular, si el agente de

escisión preseleccionado es una endopeptidasa, es preferible que el péptido adicional sea soluble en medios acuosos. Los aminoácidos que tienen grupos laterales cargados y propiedades hidrófilas, por lo tanto, se incluyen preferiblemente en el péptido adicional para promover la solubilidad, o cualquier otro aminoácido que promueva el acceso de las proteasas de escisión. Tales aminoácidos son, por ejemplo, Glu y Asp (aniónico), Arg y Lys, y Ser y Thr (neutro, hidrófilo). Si se utiliza arginina, debe tenerse en cuenta que la arginina constituye el sitio de escisión de la tripsina. Por lo tanto, en los casos en los que el péptido deba contener más arginina, la tripsina debe evitarse como proteasa de escisión. El uso de lisina también está sujeto a limitaciones. Si el péptido tiene que modificarse en el extremo N-terminal (ver más arriba), puede ser necesario proteger los grupos lisina. Por lo tanto, en tales casos, se prefiere evitar la lisina en el péptido adicional.

El sitio de escisión se selecciona típicamente de manera que no se encuentre en el péptido antifusogénico y que esté contenido preferiblemente en el péptido adicional. Los sitios de escisión química y enzimática y los correspondientes agentes utilizados para efectuar la escisión de un enlace peptídico cerca de uno de los sitios se describen, por ejemplo, en las patentes WO 92/01707 y WO 95/03405.

Ejemplos de enzimas de escisión y la secuencia de escisión se describen en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Enzima	Secuencia de escisión <sup>1)</sup>	Id. de Sec. N°:
Enteroquinasa	DDDDK	16
Factor Xa	IEGR	17
Trombina	RGPR	18
Ubiquitina	RGG	
Renina	HPFHL-LVY	19
Tripsina	D o R	
Quimiotripsina	F o Y o W	
Clostripaina	R	
V8 de <i>S. aureus</i>	G	

Escisión química:

Sustancia de escisión	Secuencia de escisión <sup>1)</sup>
BrCN	M
BNPS-escatol	W
5-nitro-5-tiocianobenzoato	C
<sup>1)</sup> Aminoácidos en código de una sola letra	

Se utiliza preferentemente tripsina, que escinde específicamente proteínas y péptidos en el extremo C-terminal de la arginina. Tal enzima se conoce, por ejemplo, de páncreas porcino o bovino o de levaduras recombinantes. La tripsina es particularmente adecuada para producir los polipéptidos deseados, si los residuos de lisina están protegidos y son atacados por la enzima.

La secuencia del péptido que puede escindir una endoproteinasa se entiende en la presente invención como una secuencia de péptidos de cadena corta que se compone preferiblemente de 1 a 20 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 10 aminoácidos, y contiene un sitio de escisión en C-terminal para la endoproteinasa deseada. Este péptido adicional contiene preferiblemente además, una combinación de varios aminoácidos (primera parte) entre el extremo N-terminal y la secuencia de reconocimiento de la endoproteinasa deseada, que preferiblemente se selecciona de entre los aminoácidos Gly, Thr, Ser, Ala, Pro, Asp, Glu, Arg y Lys. Un tramo de aminoácidos en el que de dos a ocho de estos aminoácidos adicionales son los aminoácidos cargados negativamente Asp y/ o Glu se usa preferiblemente como primera parte.

También es posible realizar la escisión usando BrCN (escisión química), siempre y cuando el péptido antifusogénico no contenga metionina.

Los péptidos de fusión se producen mediante la expresión de un DNA (secuencia de ácido nucleico) que codifica para el péptido en procariotas. El vector de expresión no contiene elementos que medien la secreción del péptido de fusión en el medio o periplasma (por ejemplo, péptidos señal). Por lo tanto, el péptido se forma como cuerpos refráctiles insolubles (IB).

El DNA que codifica el péptido de fusión se puede producir de acuerdo con los métodos conocidos en el estado de la materia. Es preferible además extender la secuencia de ácido nucleico con elementos de regulación y transcripción adicionales, a fin de optimizar la expresión en las células huésped. Un DNA que es adecuado para la expresión puede producirse preferiblemente por síntesis. Tales procesos son familiares para el experto en la materia y se describen por ejemplo en Beattie, KL, y Fowler, RF, Nature 352 (1991) 548-549; EP-B 0 424 990; Itakura, K., et al.,

Science 198 (1977) 1056-1063. También puede ser conveniente modificar la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de fusión de acuerdo con la invención.

Tales modificaciones son, por ejemplo:

- 5 - la modificación de la secuencia de ácido nucleico para introducir diferentes secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para facilitar los pasos de ligación, clonación y mutagénesis,
- la modificación de la secuencia de ácido nucleico para incorporar codones preferibles para la célula huésped,
- la extensión de la secuencia de ácido nucleico con elementos adicionales de regulación y transcripción con el fin de optimizar la expresión en la célula huésped.

10 Todos los pasos adicionales en el proceso para la producción de vectores de expresión adecuados y para la expresión son actuales y serán familiares para una persona experta en la técnica. Tales métodos se describen por ejemplo en Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, USA.

15 Como el péptido de fusión no se secreta, se agrega en la célula, preferentemente en el citoplasma. Aquí, el péptido se almacena en una forma comprimida e insoluble (cuerpos de inclusión). Esto reduce al mínimo la interferencia con las funciones celulares como la degradación proteolítica.

20 Escherichia coli, Streptomyces o Bacillus son ejemplos de organismos huésped procariotas adecuados. Para la producción de los péptidos de fusión de acuerdo con la invención, los procariotas se transforman de forma habitual con el vector que contiene el DNA que codifica para el péptido y posteriormente se hacen crecer de la forma habitual. Después de la lisis de las células se aísla el péptido insoluble inactivo (IB) en la forma usual, por ejemplo mediante centrifugación (fracción sedimentada). Los agregados del péptido insolubles deseados pueden

25 enriquecerse aún más si es necesario mediante el lavado de las fracciones sedimentadas por ejemplo, con tampones que contengan detergentes.

El péptido de fusión insoluble se solubiliza preferiblemente con soluciones alcalinas (por ejemplo, KOH, pH 10) y se escinde mediante los medios apropiados, por ejemplo, con factor Xa a pH 8,0.

30 Sorprendentemente, se ha detectado que los péptidos de fusión producidos mediante el proceso de acuerdo con la invención no se degradan en las células huésped, se forman como cuerpos de inclusión y posteriormente pueden escindirse enzimáticamente por completo sin una escisión significativa del componente péptido antifusogénico en sí mismo.

35 Los siguientes ejemplos, referencias, la Fig. 1 y el listado de secuencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

40 La Figura 1 muestra el vector de expresión que codifica la Xa-T 1357.

#### Listado de Secuencias

- Id. de Sec. Nº: 1 Gen sintético Xa-T 1357.
- Id. de Sec. Nº: 2 Péptido Xa-T1357.
- 45 Id. de Sec. Nº: 3 Cebador 1.
- Id. de Sec. Nº: 4 Cebador 2.
- Id. de Sec. Nº: 5 Cebador 3.
- Id. de Sec. Nº: 6 Cebador 4.
- Id. de Sec. Nº: 7 Péptido T1357.
- 50 Id. de Sec. Nº: 8 Péptido T680.
- Id. de Sec. Nº: 9 Péptido RSV118.
- Id. de Sec. Nº: 10 Péptido MV257.
- Id. de Sec. Nº: 11 Péptido Xa-RSV118.
- Id. de Sec. Nº: 12 Péptido Xa-MV257.
- 55 Id. de Sec. Nº: 13 Péptido M-HHHHHH-AIDV-EGR-T1357-G.
- Id. de Sec. Nº: 14 Péptido M-HHHHHH-IEGR-T1357-G.
- Id. de Sec. Nº: 15 Péptido M-HHHHHH-IEGR-T680-G.
- Id. de Sec. Nº: 16 Secuencia de escisión.
- Id. de Sec. Nº: 17 Secuencia de escisión.
- 60 Id. de Sec. Nº: 18 Secuencia de escisión.
- Id. de Sec. Nº: 19 Secuencia de escisión.

#### Ejemplo 1

65 Construcción del vector de expresión

El gen sintético Xa-T1357 tiene la siguiente estructura (desde el extremo N-terminal al C-terminal):

- sitio de escisión EcoRI
- sitio de unión ribosómica del fago T5
- aminoácidos M, R, G, S
- 5 - aminoácidos 6 x H (cola de His)
- aminoácidos A, I, D, V
- enlazante del factor Xa I, E, G, R
- secuencia de T1357 (39 aminoácidos)
- aminoácido G
- 10 - 2 codones de parada
- sitio de corte BamHI

y se describe con el Id. de Sec. N°: 1.

- 15 El gen sintético fue construido mediante síntesis génica con el uso de cuatro oligonucleótidos que consisten en la secuencia del gen con tres regiones superpuestas de 20, 21 y 20 pares de bases. La síntesis se realizó mediante una reacción de PCR de dos pasos. En el primer paso, los oligos 1 y 2, y los oligos 3 y 4 se aplicaron como molde para la síntesis completa de la porción N-terminal del gen y la porción C-terminal del gen, respectivamente. Los productos se utilizaron como molde en el segundo paso, con lo cual se aplicaron porciones iguales de estos
- 20 productos. Los cebadores 1 y 4 se utilizaron como cebadores de síntesis en este paso.

- El gen sintético resultante se digirió con EcoRI y BamHI, y también el vector pQE-30 (Qiagen, DE). Ambas digestiones de restricción se purificaron mediante extracción de gel (Qiagen) y luego se utilizaron para la ligación para la producción de un vector de expresión. La relación del inserto respecto al vector fue de 3: 1. El vector se muestra en la Fig. 1.
- 25

La secuencia y la orientación correcta de la construcción se determinaron por medio del control de restricción y secuenciación (SequiServe, DE).

- 30 Ejemplo 2

Fermentación, Aislamiento de los IB y solubilización

Fermentación y aislamiento de IB:

- 35 Las células de E. coli que contienen el vector de expresión del Ejemplo 1 se hacen crecer en un medio complejo, con selección a través de ampicilina y kanamicina. Se utiliza medio LB para el precultivo. Para el cultivo principal, se utiliza extracto de levadura como único componente complejo y como fuente de C y N, y se utiliza glicerina como fuente de C adicional. Ambos componentes se añaden en forma concentrada durante la fase de alimentación discontinua. En la fase de crecimiento adecuada se induce la expresión con IPTG. El valor de pH se ajusta a  $7 \pm 0,2$  usando ácido fosfórico/ sosa cáustica. El cultivo se llevó a cabo con una sobrepresión de hasta 0,5 bar. La presión parcial de oxígeno se controló mediante la velocidad de rotación del agitador, la aireación y/ o la tasa de dosificación. Tras la detención del crecimiento y de un período correspondiente de expresión, la biomasa se recolectó por centrifugación, inmediatamente o tras un enfriamiento, y se almacenó en estado congelado.
- 40
- 45

La proteína externa a expresar se obtiene intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión (IB), y una preparación de IB se lleva a cabo antes de la purificación. Para ello, la biomasa se disgrega con el uso de un homogeneizador y los IB se purifican en varias etapas de lavado y centrifugación.

- 50 Solubilización

5,21 g de IB (preparado a partir de 20 g de células por disgregación a alta presión en 100 mL de tampón de disgregación (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0)) se disolvieron en 206 mL de KOH 30 mM pH 12 a temperatura ambiente, mientras se agitaba.

55

El contenido de proteína solubilizado:  $c = 3,2 \text{ mg/ mL}$  (ensayo de proteínas de Bradford, Bradford MM, Analytical Biochemistry 72 (1976) 248-254)  $\rightarrow 659,2 \text{ mg}$  de proteína total. El peso molecular del péptido de fusión de:  $PM = 7161,96 (7156,05 \text{ monoisotópico})$

- 60 Los péptidos

MRGS-HHHHHH-AIDV-IEGR-RSV118-G (Id. de Sec. N°: 11)

MRGS-HHHHHH-AIDV-IEGR-MV257-G (Id. de Sec. N°: 12)

- 65 se produjeron de la misma manera, pero utilizando las secuencias RSV 118 y MV 257 (ver Tabla 1) en lugar de la secuencia "T 1357".

## Ejemplo 3

## Citraconilación y escisión

5

## a) Citraconilación

Para la citraconilación, se aplicó al péptido de fusión una mezcla de anhídrido de ácido citracónico (PM: 112,09, p = 1,245 g/ ml) y dioxano en una proporción de 1:1, en la que se utilizaba el anhídrido de ácido citracónico con un exceso de 12 veces por mol de grupo amino. Para la citraconilación fueron necesarios 0,66 g de péptido de fusión (PM: 7162, C = 3,2 mg/ ml en tampón de disgregación del Ejemplo 2b), cinco grupos amino/ molécula y 570 µl de anhídrido de ácido citracónico. El solubilizado se ajustó a un pH de 11 mediante el uso de HCl concentrado. Posteriormente, se añadió una mezcla de 570 µl de anhídrido de ácido citracónico y 570 µl de dioxano, gota a gota y la solución se tamponó con KOH 2 M, de manera que el valor pH no descendiera por debajo de 8,5. Después de ajustar el valor de pH a pH 10, la preparación se incubó durante la noche a temperatura ambiente, mientras se agitaba. La reacción se detuvo con etanolamina (21 ml de etanolamina 1 M en H<sub>2</sub>O, pH 8,0) (concentración final de etanolamina en la solución: 100 mM) y el valor de pH se ajustó a pH 8,5 mediante el uso de HCl 2 M. El material citraconilado se almacenó a -20°C.

20 Volumen total del lote de reacción: 237 ml.

## b) Escisión con tripsina

25 El lote de reacción se mezcló con 11,85 ml de NaCl 1 M (concentración final 50 mM) y con 1,25 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M (concentración final 2 mM) y lotes del mismo de 10 ml cada uno se incubaron con 1,3 U/ ml de tripsina durante 80 minutos a temperatura ambiente, mientras se agitaba. A un nivel de tripsina de 1,3 U/ ml, tiene lugar la escisión completa de la proteína de fusión. La escisión se determinó mediante geles de tripsina-SDS al 16% y análisis de HPLC. La tripsina aplicada fue la tripsina de Roche Diagnostics GmbH (grado de pureza II, actividad quimotripsina 0,0091%, actividad: 206 U/ ml).

30

## c) Determinación de la escisión por análisis de HPLC

La porción de péptido se determinó por HPLC con una curva de calibración lineal, que se preparó con Ac-T1357-G-OH sintético. Se utilizó el siguiente sistema de HPLC:

35

Columna: Pharmacia Source 15RPC ST 4.6/ 100

Eluyente: tampón A: Tris 20 mM, pH 7,5; tampón B: acetonitrilo al 70% + tampón A al 30%

Gradiente: en 28 minutos de 0% B a 100% B

Flujo: 1 ml/ min.

40

Detección: UV 226 nm

## Ejemplo 4

## Purificación

45

## a) precipitación con sulfato de amonio

Para la mezcla de reacción del Ejemplo 3b se añadió sulfato de amonio sólido (AS) (a concentración final 2 M) y, después de disolver el AS, se agitó a temperatura ambiente. El péptido precipitado se separó por centrifugación (10.000 rpm) durante 5 minutos a 4°C y el sedimentado obtenido (que contiene el péptido y la tripsina) se disolvió en 5 ml de tampón Tris (50 mM, pH 8,5).

50

## b) cromatografía en benzamidina sefarosa 6B

55 La eliminación de la tripsina de la solución descrita anteriormente se llevó a cabo por medio de una columna de benzamidina.

Aplicación: 5 mg de proteína

Columna: HR 16 (Pharmacia, h = 3,3 cm, d = 1,6 cm, V = 10 ml)

60 Material: benzamidina sefarosa 6B (Pharmacia N° 17-0568-01), regenerada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y equilibrada con tampón Tris 50 mM, pH 8,5

Caudal: 1 ml/ min.

Lavado de la columna: tampón Tris 50 mM, pH 8,5

65 Del 40 al 80% del péptido fluyó a través de la columna, el resto se unió al material de la columna. En la posterior elución con etanol al 60%, no se pudo determinar una posiblemente presente co-elución de la tripsina porque la

tripsina ya no es detectable cuando el contenido de etanol es del 20% o superior. Tanto en el material que pasó a través de la columna como en el eluido, el péptido apareció como un solo pico en el análisis HPLC, y el péptido también fue homogéneo en el gel de SDS.

5 c) Purificación mediante fenil sefarosa FF

10 Fenil sefarosa de flujo rápido (Pharmacia): 5 mg del precipitado sedimentado con AS (contenido de proteína c = 5 mg/ ml) se disolvieron en 1 ml de tampón Tris (Tris 50 mM pH 8,5) y se aplicó a la columna. El péptido se unió completamente al material de la columna y se pudo eluir con un gradiente de etanol del 20 al 60%, en Tris HCl 50 mM, pH 8,5 teniendo lugar la elución tras un largo período de retención. Las fracciones peptídicas fueron homogéneas.

Listado de referencias

- 15 Andersson, L., et al., *Biopolymers* 55 (2000) 227-250  
 Arthur, L.O., et al., *Science* 258 (1992) 1935-1938  
 Beattie, K. L., and Fowler, R. F., *Nature* 352 (1991) 548-549  
 Bradbury, A.F., and Smyth, D.G., *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 112-115  
 Bradford M.M., *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254  
 20 Bullough, P.A., et al., *Nature* 371 (1994) 37-43  
 Cao, J., et al., *J. Virol.* 67 (1993) 2747-2755  
 Carr, C.M., and Kim, P.S., *Cell* 73 (1993) 823-832  
 Carter, P.: In: Ladisch, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C.C.; Builder, S.E., Eds., *Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes*; ACS Symposium Series N° 427, American Chemical Society, págs. 181-193  
 25 (1990)  
 Chan, D.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15613-15617  
 Chan, D.C., et al., *Cell* 89 (1997) 263-273  
 Chan, D.C., et al., *Cell* 93 (1998) 681-684  
 Chen, C.H., et al., *J. Virol.* 67 (1995) 3771-3777  
 30 Das, A., *Methods Enzymol.* 182 (1990) 93-112  
 DE 30 34 045  
 Doebeli, H., et al, *Protein Expression and Purification* 12 (1998) 404-414  
 EP 0 186 069  
 EP 0 673 948  
 35 EP-A 0 467 839  
 EP-B 0 424 990  
 EP-B 0 041 767  
 EP-B 0 067 540  
 Fischer, B., et al., *Arzneimittelforschung* 42 (1992) 1512-1515  
 40 Gallaher, W.R., et al., *Aids Res. Hum. Retrovirus* 5 (1989) 431-440  
 Goldberg et al., *Maximizing Gene Expression* (1986), pp. 287-314, eds. Reznikoff, W., and Gold, L., Butterworks, Stoneham, MA  
 Guise, A.D., et al., *Mol. Biotechnol.* 6 (1996) 53-64  
 Hammarskjöld, M.-L., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 989 (1989) 269-280  
 45 Hengen, P., *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 285-286  
 Hockney, R.C., *Trends Biotechnol.* 12 (1994) 456-463  
 Itakura, K., et al., *Science* 198 (1977) 1056-1063  
 Jakubke, H.D., *Peptide, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg* (1996), p. 198  
 Jones, J.H., *J. Pept. Sci.* 6 (2000) 201-207  
 50 Judice, J. K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 13426-13430  
 Kilby, J.M., et al., *Nature Medicine* 4 (1998) 1302-1307  
 Knaus, R., and Bujard, H., *EMBO Journal* 7 (1988) 2919-2923  
 Lambert, D.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2186-2191  
 Lanzer, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8973-8977  
 55 Lawless, M.K., et al., *Biochemistry* 35 (1996) 13697-13708  
 Lepage, P., et al., *Analytical Biochemistry* 213 (1993) 40-48  
 Lilie, H., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998) 497-501  
 Maddon, P.J., et al., *Cell* 47 (1986) 333-348  
 Malashkevich, V.N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 9134-9139  
 60 McDougal, J.S., et al., *Science* 231 (1986) 382-385  
 Mergler, M., et al., *Tetrahedron Letters* 29 (1988) 4005-4008 and 4009-4012  
 Misawa, S., et al., *Biopolymers* 51 (1999) 297-307  
 Ningyi, L., et al., *Gaojishu Tongxun* 10 (2000) 28-31  
 Pandjaitan, B., et al., *Gene* 237 (1999) 333-342  
 65 Parks, T.D., et al., *Anal. Biochem.* 216 (1994) 413-417  
 Pohlner, J., et al., *Nature* 325 (1987) 458-462

Polyak, S.W., et al., *Protein Eng.* 10 (1997) 615-619  
 Rimsky, L.T., et al., *J. Virol.* 72 (1998) 986-993  
 Root, M.J., et al., *Science* 291 (2001) 884-888  
 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA  
 Skelly, J.V., et al., *Methods Mol. Biol.* 56 (1996) 23-53  
 Studier, F.W., et al., *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89  
 Tan, K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12303-12308  
 Turner, B.G., and Summers, M.F., *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 1-32  
 U.S. Patente N° 4.551.433  
 U.S. Patente N° 5.453.363  
 U.S. Patente N° 5.464.933  
 U.S. Patente N° 5.635.371  
 U.S. Patente N° 5.656.456  
 U.S. Patente N° 5.656.480  
 U.S. Patente N° 6.013.263  
 U.S. Patente N° 6.017.536  
 U.S. Patente N° 6.020.459  
 U.S. Patente N° 6.060.065  
 U.S. Patente N° 6.093.794  
 Uhlen and Moks, *Gene Fusions For Purposes of Expression, An Introduction in Methods in Enzymology* 185 (1990) 129-143, Academic Press  
 van Heeke, G., et al., *Method Mol. Biol.* 36 (1994) 245-260  
 Weissenhorn, W., et al., *Nature* 387 (1997) 426-430  
 Wild, C.T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9770-9774  
 Wilson, LA., et al., *Nature* 289 (1981) 366-373  
 WO 00/31279  
 WO 00/69902  
 WO 92/01707  
 WO 94/01451  
 WO 95/03405  
 WO 96/19495  
 WO 96/40191  
 WO 99/48513  
 WO 99/59615  
 Zhang, J.-H., et al., *Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue* 36(4) (2000) 515-517  
 Zhao, X., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 14172-14177  
  
 Listado de secuencias  
 <110> F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 <120> Métodos para la producción recombinante de inhibidores peptídicos de la fusión antiviral  
 <130> Caso 20904  
 <140>  
 <141>  
 <160> 20  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 221  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: gen sintético Xa-T 1357

ES 2 525 317 T3

<220>

<221> CDS

5 <222> (32)..(211)

<400> 1

```

cgaggaattc attaaagagg agaaattaac t atg aga gga tcg cat cat cat      52
                               Met Arg Gly Ser His His His
                               1           5

cat cat cat gct atc gat gtt att gaa ggc cgt tgg cag gaa tgg gaa      100
His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu Gly Arg Trp Gln Glu Trp Glu
          10           15           20

cag aaa att acc gcc ctg ctg gaa cag gcg caa att cag caa gag aaa      148
Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys
          25           30           35

aac gaa tat gag ctg cag aaa ctg gat aag tgg gcg agc ctg tgg gaa      196
Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu
          40           45           50           55

tgg ttc ggc taa tga ggatccagct      221
Trp Phe Gly
          60
    
```

10

<210> 2

<211> 58

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<223> Descripción de la secuencia artificial: gen sintético Xa-T 1357

20

<400> 2

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu
  1           5           10           15
Gly Arg Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln
          20           25           30
Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp
          35           40           45
Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe Gly
          50           55
    
```

25

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

30

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 525 317 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 1

<400> 3

5

```
cgaggaattc attaaagagg agaaattaac tatgagagga tcgcatcatc atcatcatca 60
tgctatcgat                                     70
```

<210> 4

10

<211> 70

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 2

20

<400> 4

```
agcagggcgg taattttctg ttccattcc tgccaacggc cttcaataac atcgatagca 60
tgatgatgat                                     70
```

<210> 5

25

<211> 71

<212> DNA

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 3

35

<400> 5

```
acagaaaatt accgccctgc tggaacaggc gcaaattcag caagagaaaa acgaatatga 60
gctgcagaaa c                                     71
```

40

<210> 6

<211> 71

<212> DNA

45

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 4

<400> 6

```
agctggatcc tcattagccg aaccattccc acaggctcgc cacttatcc agtttctgca 60
gctcatattc g                                     71
```

55

<210> 7

<211> 39

ES 2 525 317 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido T1357

10 <400> 7

```
Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln
  1           5           10           15
Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp
          20           25           30
Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe
          35
```

<210> 8

15

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido T680

25

<400> 8

```
Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
  1           5           10           15
Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
          20           25           30
Trp Asn Trp Phe
          35
```

30 <210> 9

<211> 35

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido RSV118

<400> 9

ES 2 525 317 T3

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly  
 20 25 30  
 Lys Ser Thr  
 35

- <210> 10
- 5 <211> 35
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido MV257
- 15 <400> 10

Leu His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp  
 1 5 10 15  
 Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys  
 20 25 30  
 Glu Leu Leu  
 35

- <210> 11
- 20 <211> 54
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido Xa-RSV118
- 30 <400> 11

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn  
 35 40 45  
 Ala Gly Lys Ser Thr Gly  
 50

- 35 <210> 12

ES 2 525 317 T3

<211> 54

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido Xa-MV257

<400> 12

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu
  1           5           10           15
Gly Arg Leu His Arg Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg
           20           25           30
Leu Asp Val Gly Thr Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp
           35           40           45
Ala Lys Glu Leu Leu Gly
  50
    
```

15

<210> 13

<211> 52

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido M-HHHHHH-AIDV-IEGR-T1357-G

<400> 13

```

Met His His His His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu Gly Arg Tyr
  1           5           10           15
Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
           20           25           30
Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
           35           40           45
Asn Trp Phe Gly
  50
    
```

30

<210> 14

<211> 51

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de la secuencia artificial:peptide M-HHHHHH-IEGR-T1357-G

ES 2 525 317 T3

<400> 14

```

Met His His His His His His Ile Glu Gly Arg Trp Gln Glu Trp Glu
  1           5           10           15
Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys
           20           25           30
Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu
           35           40           45
Trp Phe Gly
           50
    
```

5

<210> 15

<211> 48

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido M-HHHHHH-IEGR-T680-G

<400> 15

```

Met His His His His His His Ile Glu Gly Arg Tyr Thr Ser Leu Ile
  1           5           10           15
His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln
           20           25           30
Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Gly
           35           40           45
    
```

20

<210> 16

<211> 42

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido MR-T1357-G

<400> 16

35

```

Met Arg Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln
  1           5           10           15
Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp
           20           25           30
Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe Gly
           35           40
    
```

<210> 17  
<211> 5  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión  
15 <400> 17

**Asp Asp Asp Asp Lys**  
1 5

<210> 18  
20 <211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión  
30 <400> 18

**Ile Glu Gly Arg**  
1

35 <210> 19  
<211> 4  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial  
<220>  
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión  
<400> 19

**Arg Gly Pro Arg**  
1

50 <210> 20  
<211> 8  
55 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
60 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de escisión

<400> 20

His Pro Phe His Leu Leu Val Tyr  
 1 5

5 Listado de secuencias

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE

<120> Métodos para la producción recombinante de inhibidores peptídicos de la fusión antiviral

10

<130> Caso 20904

<140>

15

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 221

25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Descripción de la secuencia artificial: gen sintético Xa-T 1357

<220>

35

<221> CDS

<222> (32)..(211)

40

<400> 1

```

cgaggaattc attaaagagg agaaattaac t atg aga gga tcg cat cat cat      52
                               Met Arg Gly Ser His His His
                               1 5

cat cat cat gct atc gat gtt att gaa ggc cgt tgg cag gaa tgg gaa      100
His His His Ala Ile Asp Val Ile Glu Gly Arg Trp Gln Glu Trp Glu
          10          15          20

cag aaa att acc gcc ctg ctg gaa cag gcg caa att cag caa gag aaa      148
Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys
          25          30          35

aac gaa tat gag ctg cag aaa ctg gat aag tgg gcg agc ctg tgg gaa      196
Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Glu
          40          45          50          55

tgg ttc ggc taa tga ggatccagct      221
Trp Phe Gly
          60
    
```

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para la producción de un péptido antifusogénico como un péptido de fusión de una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 70 aminoácidos en una célula huésped procariótica, que se caracteriza porque, en condiciones tales que se formen cuerpos de inclusión de dicho péptido de fusión,
- 10 a) en dicha célula huésped se expresa un ácido nucleico que codifica dicho péptido de fusión que consta de dicho péptido antifusogénico de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos unido por el extremo N-terminal a un péptido adicional de una longitud de alrededor de 4 a aproximadamente 30 aminoácidos;
- b) dicha célula huésped se hace crecer en cultivo;
- 15 c) se forman dichos cuerpos de inclusión, se recuperan y se solubilizan;
- d) se aísla dicho péptido de fusión,
- y dicho péptido de fusión es representado por la Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 y dicho péptido antifusogénico consiste en una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 7, 9 o 10, o de un fragmento de la misma.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque dicho péptido antifusogénico se escinde de dicho otro péptido durante o después de la solubilización de dichos cuerpos de inclusión.
- 25 3. Un ácido nucleico que codifica un péptido de fusión de una longitud de alrededor de 14 a aproximadamente 70 aminoácidos que consta de un péptido antifusogénico de una longitud de alrededor de 10 a aproximadamente 50 aminoácidos unido por el extremo N-terminal a un péptido adicional de una longitud de aproximadamente 4 a alrededor de 30 aminoácidos, en el que dicho péptido de fusión está representado por el Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 y dicho péptido antifusogénico consiste en una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 7, 9 o 10 o de un fragmento de la misma.
- 30 4. Un vector de expresión procariota que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido de fusión de una longitud de alrededor de 14 a aproximadamente 70 aminoácidos que consta de un péptido antifusogénico de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos unido en el extremo N-terminal a un péptido adicional de una longitud de alrededor de 4 a aproximadamente 30 aminoácidos, en el que dicho péptido de fusión se representa por el Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 y dicho péptido antifusogénico consiste en una secuencia de
- 35 aminoácidos de Id. de Sec. N°: 7, 9 o 10 o de un fragmento de la misma.
- 40 5. Una preparación de cuerpos de inclusión de un péptido de fusión de una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 70 aminoácidos que consta de un péptido antifusogénico de una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos unido en el extremo N-terminal a un péptido adicional de una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 aminoácidos, en el que dicho péptido de fusión está representado por Id. de Sec. N°: 2, 11 o 12 y dicho péptido antifusogénico consiste en una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 7, 9 o 10 o de un fragmento de la misma.

Fig. 1

