

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 119**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2009 PCT/JP2009/003932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10021126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2009 E 09808062 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2330114**

54 Título: **Método de producción de glicoproteína y método de selección**

30 Prioridad:

19.08.2008 JP 2008211144
11.02.2009 JP 2009029206

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2017

73 Titular/es:

GLYTECH, INC. (100.0%)
134, Chudoji-minamimachi, Shimogyo-ku, Kyoto-
shi
Kyoto 600-8813, JP

72 Inventor/es:

KAJIHARA, YASUHIRO y
FUKAE, KAZUHIRO

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 646 119 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

Método de producción de glicoproteína y método de selección

[Campo técnico]

5 **[0001]** La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a un método para producir una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior.

[Antecedentes de la técnica]

10 **[0002]** Recientemente, se ha llevado a cabo una investigación sobre la utilización de una glicoproteína como diversas medicinas. La fracción de cadena de azúcar de una glicoproteína cumple una función de impartición de resistencia a la glicoproteína contra una proteasa con el fin de retrasar la metabolización de la glicoproteína fuera de la sangre, una función de constituir una señal que controla el traslado de la glicoproteína a orgánulos dentro de una célula y similares. En consecuencia, la adición de una cadena de azúcar adecuada permite el control de la vida media sanguínea y el traslado intracelular de una glicoproteína.

15 **[0003]** La eritropoyetina (EPO) es un ejemplo representativo que muestra que una cadena de azúcar afecta a la actividad fisiológica de una glicoproteína. Esta glicoproteína es una hormona de diferenciación de hematocito, que cumple una función de mantener el recuento de eritrocitos en la sangre periférica actuando en células progenitoras eritroides para impulsar su proliferación y diferenciación. Un estudio sobre la correlación entre la estructura de cadena de azúcar de la EPO y su actividad fisiológica reveló que aunque la EPO carente de una cadena de azúcar todavía mostraba una actividad fisiológica *in vitro*, se excretaba fácilmente a través del riñón *in vivo*, y no mostraba una actividad fisiológica suficiente.

20

[0004] Además, cuando una glicoproteína tiene una cadena de azúcar imperfecta y también cuando una cadena de azúcar diferente está enlazada a una glicoproteína, dicha glicoproteína puede eliminarse de la sangre tras reconocimiento mediante macrófagos y similares presentes en la sangre.

25 **[0005]** En consecuencia, cuando una glicoproteína se utiliza como producto farmacéutico, es deseable que cada proteína tenga una cadena de azúcar con estructura uniforme enlazada a la misma posición.

[0006] Tradicionalmente, como método de producción de una glicoproteína, se utiliza ampliamente un método de añadir enzimáticamente un azúcar a una proteína. Sin embargo, en este método, no puede añadirse una cadena de azúcar uniforme; asimismo, es difícil aplicar de manera uniforme modificación y recorte tras la adición de una cadena de azúcar.

30 **[0007]** Además, si bien una preparación de proteína se calcula, por lo general, a partir de su título, existe una posibilidad de que las preparaciones con el mismo título puedan contener proteínas con diversas estructuras de cadena de azúcar, lo que puede provocar variación en la vida media sanguínea o provocar un problema en términos de control de calidad.

35 **[0008]** Los presentes inventores han desarrollado, hasta la fecha, un método que permite la producción de una cantidad relativamente grande de una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes a partir de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble y una cadena de azúcar unida a asparagina (por ejemplo, véase la literatura de patente 1). Asimismo, han desarrollado un derivado de cadena de azúcar de tipo complejo aminada y una glicoproteína capaz de mantener concentraciones sanguíneas suficientes (por ejemplo, véase la literatura de patente 2). Cualquiera de las glicoproteínas anteriores está pensada para utilizarse como producto farmacéutico.

40

[0009] Mientras tanto, para utilizarse como producto farmacéutico, ha de producirse una glicoproteína que tenga una actividad fisiológica constante. Tanto la estructura de secuencia de aminoácidos como de cadena de azúcar y la estructura de orden superior de la fracción de proteína se considera que están estrechamente relacionadas con la función de una glicoproteína.

45 **[0010]** La estructura de orden superior de una proteína se estabiliza por medio de un enlace de hidrógeno, un enlace iónico y una interacción hidrofóbica entre residuos de aminoácidos, así como un enlace S-S entre residuos de cisteína, y similares, y la mayoría de proteínas tiene cada una una estructura de orden superior única. Sin embargo, los enlaces diferentes a un enlace S-S son relativamente débiles y, por consiguiente, se destruye una estructura de orden superior de la proteína mediante calentamiento y presión relativamente suaves y similares, mediante lo que se reduce y se pierde la actividad fisiológica de la proteína. Esto se denomina desnaturalización de proteínas. Además, en particular, cuando la cadena de aminoácidos es larga, al generarse más de una estructura que proporciona el punto de energía mínimo, puede producirse una estructura de orden superior anormal (plegado erróneo). También en este caso, se informa que la actividad de las proteínas cambia o se pierde.

50

[0011] Según los hechos anteriores, se considera, por lo general, que es esencial una estructura de orden superior correcta con el fin de que una proteína muestre su función y cuando se pliegan las proteínas, se separan bien en una proteína plegada correctamente que tiene una actividad fisiológica, bien en una proteína plegada de forma errónea carente de una actividad fisiológica.

5 **[0012]** Si bien se han llevado a cabo distintas investigaciones sobre la relación entre la estructura de orden superior de una proteína y la actividad fisiológica, no se ha informado sobre el impacto que puede tener una cadena de azúcar en el plegado y la actividad fisiológica de una glicoproteína sintetizada artificialmente.

10 **[0013]** Los presentes inventores sintetizaron fragmentos de glicoproteína según el método de la literatura de patente 1 y los unió a otros fragmentos peptídicos mediante ligación química nativa (NCL, por sus siglas en inglés) para sintetizar la proteína 3 quimiotáctica de monocitos. La proteína 3 quimiotáctica de monocitos así sintetizada se plegó y se confirmó la posición de un enlace disulfuro mediante tratamiento con quimotripsina. Como resultado, se descubrió que mientras que el enlace disulfuro se formó en una posición correcta en aproximadamente un 90 % de glicoproteína, el enlace disulfuro se formó en una posición diferente de la posición normal en aproximadamente un 10 % de glicoproteína (literatura no patente 1).

15 **[0014]** Sin embargo, según la literatura anterior, no se observa dicha variación en la posición del enlace disulfuro cuando se pliegan dos o más tipos diferentes de glicoproteínas. Teniendo en cuenta una posibilidad de reformación de enlace disulfuro durante el tratamiento con quimotripsina, no puede descartarse una posibilidad de que no se produjeran dos o más tipos de plegado pero el tratamiento con quimotripsina simplemente produjera dos o más tipos de resultados. En consecuencia, evidentemente no se ha llevado a cabo ningún estudio ni sobre una diferencia en la actividad fisiológica de una glicoproteína que tiene un enlace disulfuro formado en una posición correcta ni sobre una glicoproteína que tiene un enlace disulfuro formado en una posición diferente de la posición normal.

20 **[0015]** Además, la proteína ovomucoide es una de las glicoproteínas cuya función y estructura se han estudiado relativamente en profundidad. La proteína ovomucoide es un tipo de proteína contenida en la clara de huevo con un peso molecular de aproximadamente 28, 000. Tiene tres dominios dentro de la molécula, cada uno de los cuales tiene una actividad inhibitoria sobre diferentes proteasas. En concreto, el tercer dominio se estudia en detalle, ya que presenta una actividad inhibitoria incluso por sí sólo. Hasta la fecha, se ha informado sobre la estructura del tercer dominio derivada de 100 o más tipos de aves, y también se ha elucidado su conformación mediante cristalografía de rayos X.

30 **[0016]** En lo que se refiere a la estereoestructura de un tercer dominio de ovomucoide sintetizado químicamente, por ejemplo, se informa de que un tercer dominio de ovomucoide con supercántigo de péptido modificado se sintetiza mediante NCL y, a continuación, se analiza mediante cristalografía de rayos X (véase la literatura no patente 2).

35 **[0017]** Asimismo, también se informa de que, cuando se plegó un tercer dominio de ovomucoide sintetizado mediante síntesis escalonada y NCL, se obtuvo un resultado que indicaba claramente que el tercer dominio correctamente plegado se obtuvo por medio de análisis de estabilidad térmica (véase la literatura no patente 3).

[Literatura de patente]

[0018]

40 [Literatura de patente 1] WO2004/005330
[Literatura de patente 2] WO2005/010053

[Literatura no patente]

[0019]

45 [Literatura no patente 1] Yamamoto *et al.*, Journal of American Chemical Society, 2008, 130, 501-510
[Literatura no patente 2] Bateman *et al.*, Journal of Molecular Biology (2001) 305, 839-849
[Literatura no patente 3] Lu *et al.*, Journal of American Chemical society, 1996, 118, 8518-8523

[Sumario de la invención]

[Problema que se ha de solucionar mediante la invención]

50 **[0020]** Sin embargo, de acuerdo con la tecnología convencional mencionada, no se añade ninguna cadena de azúcar a una proteína sintetizada y, en consecuencia, no se sabe en qué medida afecta una cadena de azúcar al plegado y a la actividad fisiológica de una glicoproteína.

[0021] Habida cuenta de lo anterior, un objeto de la presente invención es dar a conocer una glicoproteína que tiene tanto una función basada en cadena de azúcar uniforme, tal como la vida media sanguínea, como una

actividad fisiológica uniforme, es decir, una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior.

5 **[0022]** Además, otro objeto de la presente invención es dar a conocer un método de selección para seleccionar una glicoproteína que tiene una actividad predeterminada entre diversos tipos de glicoproteínas con diversa intensidad de la actividad fisiológica y dar a conocer una mezcla de glicoproteínas que tiene una actividad deseada.

[Medios para solucionar el problema]

10 **[0023]** Los presentes inventores han descubierto que, mediante la síntesis de un tercer dominio de proteína ovomucoide que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos y de cadena de azúcar, y el plegado del producto así obtenido, puede obtenerse una mezcla que contiene diversos tipos de estructuras de orden superior con una proporción constante con buena reproducibilidad. Asimismo, a medida que separaban el producto resultante y medían su actividad fisiológica, a diferencia de lo que se ha entendido tradicionalmente, se confirmó que había diversos tipos de estructuras de orden superior que tenían el mismo tipo de actividad fisiológica a un nivel considerado como relativamente muy activo y, a pesar de ser relativamente muy activa, la actividad variaba en función de la estructura de orden superior, así como que las glicoproteínas con diversas estructuras de orden superior podrían separarse y purificarse mediante cromatografía en columna.

20 **[0024]** Además, han descubierto que una glicoproteína diferente de la glicoproteína que tiene una actividad predeterminada puede convertirse en la estructura de orden superior que se obtiene con una proporción constante, como se ha descrito anteriormente, desplegándose una vez y, a continuación, volviéndose a plegar; y, en consecuencia, una glicoproteína que tiene una estructura de orden superior que presenta una actividad predeterminada puede recogerse al máximo mediante la repetición de la etapa de desplegado y de nuevo plegado.

25 **[0025]** Es decir, la presente invención, como se define en las reivindicaciones, da a conocer un método para producir una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior, que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

- (a) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes;
- (b) fraccionar la glicoproteína plegada mediante cromatografía en columna; y
- (c) recoger una fracción que tiene una actividad predeterminada.

30 **[0026]** Preferiblemente, el método mencionado anteriormente también incluye, después de la etapa (c), las etapas de:

- (d) desplegar una glicoproteína contenida en una fracción no recogida en la etapa (c);
- (e) volver a plegar la glicoproteína desplegada;
- (f) fraccionar la glicoproteína que se ha vuelto a plegar mediante cromatografía en columna y recoger una fracción que tiene una actividad predeterminada; y
- 35 (g) repetir las etapas (d) a (f) según sea necesario.

[0027] La presente invención da a conocer además un método para la selección de una glicoproteína que tiene una actividad fisiológica predeterminada, que comprende las siguientes etapas (i) a (iii):

- 40 (i) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes;
- (ii) fraccionar la glicoproteína plegada mediante cromatografía en columna; y
- (iii) medir una actividad de cada una de las fracciones para determinar si tiene o no una actividad predeterminada.

45 **[0028]** La presente invención da a conocer además un método para obtener una mezcla de glicoproteínas que tiene una actividad fisiológica deseada, que comprende las siguientes etapas (A) a (D):

- (A) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes;
- (B) fraccionar la glicoproteína plegada mediante cromatografía en columna;
- (C) medir una actividad de cada una de las fracciones; y
- 50 (D) determinar una proporción de mezcla de las fracciones para obtener una actividad deseada y mezclar las fracciones de acuerdo con la proporción así obtenida.

[0029] Preferiblemente, de acuerdo con el método de producción de una glicoproteína, el método de selección de una glicoproteína o el método para obtener una mezcla de glicoproteínas que tiene una actividad fisiológica deseada de la presente invención, al menos una parte de la glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes se produce por medio de un método que comprende las siguientes etapas (1) a (6):

(1) esterificar un grupo hidroxilo de una resina que tiene un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble;

(2) eliminar el grupo protector liposoluble para generar un grupo amino libre;

5 (3) amidar el grupo amino libre y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble;

(4) después de la etapa (3), eliminar el grupo protector liposoluble para generar un grupo amino libre;

(5) repetir las etapas (3) y (4) una o más veces; y

10 (6) escindir un enlace éster formado en la etapa (1) por un ácido.

[0030] Asimismo, preferiblemente, de conformidad con el método de producción anterior de una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes, una parte de la glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes se produce mediante las etapas (1) a (6) y la glicoproteína se produce por medio del método que comprende además la siguiente etapa (7):

(7) unir una parte de la glicoproteína obtenida en la etapa (6) con otros péptidos o glicopeptidos mediante un método de ligación.

[Efectos de la invención]

[0031] De acuerdo con el método de producción de una glicoproteína de la presente invención, puede obtenerse una glicoproteína que tiene tanto una estructura uniforme de secuencia de aminoácidos y de cadena de azúcar como una estructura de orden superior. Por lo tanto, puede producirse una glicoproteína que presenta de manera uniforme una actividad fisiológica predeterminada además de una vida media sanguínea y un traslado intracelular constantes.

[0032] Asimismo, de acuerdo con el método para la selección de una glicoproteína de la presente invención, puede seleccionarse una glicoproteína que tiene de manera uniforme una actividad fisiológica predeterminada entre un grupo de una glicoproteína que presenta actividades fisiológicas distintas debido a diferentes estructuras de orden superior. Puesto que esta glicoproteína tiene una estructura de cadena de azúcar uniforme, también presenta una función basada en cadena de azúcar uniforme, tal como la vida media sanguínea y el traslado intracelular.

[0033] Además, de acuerdo con la presente invención, puede controlarse una mezcla de glicoproteínas con el fin de lograr una actividad deseada.

[0034] Los efectos de la presente invención, como se han descrito anteriormente, son particularmente ventajosos cuando se utiliza una glicoproteína como producto farmacéutico.

[Breve descripción de los dibujos]

35 **[0035]**

[Figura 1] En la figura 1, se muestra el tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado (OMSVP3) y las secuencias de aminoácidos de los fragmentos 1 a 3, que se utilizan para la síntesis química de OMSVP3.

[Figura 2] En la figura 2, se muestra el fragmento 1 (tioesterificado), que se utiliza para la síntesis química de OMSVP3.

40 [Figura 3] En la figura 3, se muestra el fragmento 2 (tioesterificado), que se utiliza para la síntesis química de OMSVP3 glicosilado.

[Figura 4] En la figura 4, se muestra el fragmento 3, que se utiliza para la síntesis química de OMSVP3.

[Figura 5] La figura 5 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de la síntesis del fragmento 1.

45 [Figura 6] La figura 6 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de la síntesis del fragmento 2.

[Figura 7] La figura 7 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de la síntesis del fragmento 3.

[Figura 8] La figura 8 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de unión de los fragmentos 2 y 3 mediante NCL.

50 [Figura 9] La figura 9 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de unión de los fragmentos 2 y 3 y el fragmento 1 mediante NCL.

- [Figura 10] La figura 10 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en la separación de OMSVP3 glicosilado plegado mediante HPLC.
- [Figura 11] La figura 11 es un espectro de RMN de la fracción B en la figura 10.
- [Figura 12] La figura 12 es un espectro CD de la fracción B en la figura 10.
- 5 [Figura 13] En la figura 13, se muestran los resultados de medición de la actividad inhibitoria de cada una de las fracciones en la figura 10 contra quimotripsina.
- [Figura 14] En la figura 14, se muestra el fragmento 2' (tioesterificado), que se utiliza para la síntesis química de OMSVP3 no glicosilado.
- [Figura 15] La figura 15 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de la síntesis del fragmento 2'.
- 10 [Figura 16] La figura 16 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de unión del fragmento 2' y el fragmento 3 mediante NCL.
- [Figura 17] La figura 17 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en cada etapa de unión de los fragmentos 2' y 3 y el fragmento 1 mediante NCL.
- 15 [Figura 18] La figura 18 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en la separación de OMSVP3 no glicosilado plegado mediante HPLC.
- [Figura 19] La figura 19 es un espectro de RMN de la fracción F en la figura 18.
- [Figura 20] La figura 20 es un espectro CD de la fracción F en la figura 18.
- [Figura 21] En la figura 21, se muestran los resultados de medición de la actividad inhibitoria de cada una de las fracciones en la figura 18 contra quimotripsina.
- 20 [Figura 22] En la figura 22, se muestra una curva de calibración de la fracción F.
- [Figura 23] En la figura 23, se muestra el porcentaje de inhibición de las fracciones A a D contra quimotripsina.
- [Figura 24] En la figura 24, se muestran los valores IC₅₀ de las fracciones A a D.
- 25 [Figura 25] En la figura 25, se muestra el porcentaje de inhibición de las fracciones E a H contra quimotripsina.
- [Figura 26] En la figura 26, se muestran los valores IC₅₀ de las fracciones E a H.
- [Figura 27] En la figura 27, se muestra un espectro CD de la fracción B en diversas temperaturas.
- [Figura 28] En la figura 28, se muestra un espectro CD de la fracción F en diversas temperaturas.
- 30 [Figura 29] La figura 29 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en la digestión con termolisina de la fracción B.
- [Figura 30] En la figura 30, se muestran los resultados del análisis de espectrometría de masas de fragmentos peptídicos resultantes de la digestión con termolisina de la fracción B.
- [Figura 31] La figura 31 es un cromatograma a una longitud de onda de 220 nm en la digestión con termolisina de la fracción F.
- 35 [Figura 32] En la figura 32, se muestran los resultados del análisis de espectrometría de masas de fragmentos peptídicos resultantes de la digestión con termolisina de la fracción F.
- [Figura 33] En la figura 33, se muestran los resultados de la determinación de la posición de un enlace disulfuro mediante digestión con termolisina de la fracción B.
- 40 [Figura 34] En la figura 34, se muestran los resultados de la determinación de la posición de un enlace disulfuro mediante digestión con termolisina de la fracción F.
- [Figura 35] En la figura 35, se muestra la curva de calibración del péptido sustrato.
- [Figura 36] En la figura 36, se muestra el gráfico de Michaelis-Menten del péptido sustrato.
- [Figura 37] En la figura 37, se muestra la velocidad de reacción del péptido sustrato por unidad de tiempo.
- 45 [Descripción detallada de los modos de realización preferidos]

[0036] A continuación, se describirán modos de realización preferidos de la presente invención.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, una "proteína" no se limita específicamente siempre que sea un conjunto de una pluralidad de aminoácidos enlazados mediante un enlace amida e incluye una proteína conocida, una proteína nueva y una proteína modificada. En un modo de realización preferido, en la fracción de proteína de la glicoproteína obtenida mediante el método de producción de la presente invención, una pluralidad de aminoácidos están enlazados mediante el mismo enlace amida como una proteína de origen natural (enlace peptídico). La proteína, tal como se utiliza en el presente documento, tiene longitud suficiente para plegarse en una estructura de orden superior predeterminada.

50

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, una "proteína modificada" se refiere a una proteína modificada de forma natural o artificial. Entre los ejemplos de dicha modificación, se incluye la alquilación, la acilación (por ejemplo, la acetilación), la amidación (por ejemplo, la amidación del extremo C-terminal de una proteína), la carboxilación, la formación de un éster, la formación de un enlace disulfuro, la glicosilación, la lipidación, la fosforilación, la hidroxilación y la unión de un compuesto marcador, que se aplican a uno o más residuos de aminoácidos de una proteína.

55

[0039] El término "péptido", tal como se utiliza en el presente documento, se utiliza como sinónimo de proteína, en principio. No obstante, también puede utilizarse para referirse a una parte de una proteína y a una cadena de aminoácidos relativamente corta que no forma una estructura de orden superior.

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, un "aminoácido" se utiliza en el sentido más amplio, y entre los ejemplos de los mismos, se incluye, además de aminoácido de origen natural como serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro), un aminoácido de origen no natural, tal como un mutante y un derivado de un aminoácido. Los expertos en la materia entenderían, habida cuenta de la amplia definición anterior, que los ejemplos de un aminoácido utilizado en la presente invención incluyen un L-aminoácido; un D-aminoácido; un aminoácido modificado químicamente, tal como un mutante y un derivado de un aminoácido; un aminoácido constituyente no proteico en el cuerpo vivo, tal como norleucina, β -alanina y ornitina; y un compuesto sintetizado químicamente que tiene características de un aminoácido que un experto en la materia conoce. Entre los ejemplos de un aminoácido de origen no natural, se incluye un ácido α -metilamino (por ejemplo, α -metilalanina), un D-aminoácido, un aminoácido similar a la histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β -hidroxilo-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina, y α -metil-histidina), un aminoácido que tiene un metileno más en la cadena lateral (un "homo" aminoácido), y un aminoácido en el que un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se sustituye por un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, un ácido cisteico).

[0041] En un modo de realización preferido, la fracción de proteína de la glicoproteína obtenida mediante el método de producción de la presente invención, está compuesta completamente por aminoácidos que están presentes en el cuerpo vivo como aminoácidos constituyentes de una proteína o una glicoproteína.

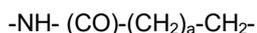
[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, una "glicoproteína" no se limita específicamente siempre que sea un compuesto obtenido mediante la adición de al menos una cadena de azúcar a la proteína mencionada anteriormente e incluye una glicoproteína conocida y una glicoproteína nueva. El término "glicopéptido", tal como se utiliza en el presente documento, se utiliza como sinónimo de glicoproteína, en principio. No obstante, también puede utilizarse para indicar una parte de una glicoproteína y un péptido obtenidos mediante la unión de una cadena de azúcar al péptido mencionado anteriormente.

[0043] En un modo de realización preferido, la glicoproteína obtenida mediante el método de producción de la presente invención es una proteína que tiene una cadena de azúcar unida a N o una cadena de azúcar unida a O y ejemplos de las mismas incluyen una parte de un péptido o todo el péptido, tal como eritropoyetina, interleucina, interferón- β , un anticuerpo, proteína 3 quimiotáctica de monocitos (MCP-3) y una proteína ovomucoide.

[0044] En una glicoproteína, una cadena de azúcar y un residuo de aminoácido de la proteína pueden estar enlazados directamente o mediante un enlace. Si bien no se impone ninguna limitación particular en el sitio de unión de la cadena de azúcar y el aminoácido, un aminoácido se enlaza, preferiblemente, al extremo reductor de la cadena de azúcar.

[0045] No se impone ninguna limitación particular sobre el tipo de aminoácido al que se enlaza una cadena de azúcar y una cadena de azúcar puede enlazarse bien a un aminoácido de origen natural o de origen no natural. Desde el punto de vista de que la glicoproteína tiene la misma estructura o una estructura similar que una glicoproteína presente en el cuerpo vivo, la cadena de azúcar se enlaza, preferiblemente, a Asn como una cadena de azúcar unida a N o a Ser o Thr como una cadena de azúcar unida a O. En concreto, en el caso de una cadena de azúcar unida a N, la glicoproteína obtenida mediante el método de producción de la presente invención es, preferiblemente, una glicoproteína que tiene una estructura en la que una cadena de azúcar está enlazada a Asn y un aminoácido (X) diferente a una prolina está enlazado al extremo C-terminal de la Asn mediante un enlace amida (enlace peptídico) y, además, Thr o Ser está enlazada al extremo C-terminal del X mediante un enlace amida (enlace peptídico) (Asn-X-Thr/Ser glicosilada). Cuando la cadena de azúcar y el aminoácido están enlazados a través de un enlace, desde la perspectiva de una propiedad de fácil unión al enlace, el aminoácido al que está enlazado una cadena de azúcar es, preferiblemente, un aminoácido que tiene dos o más grupos carboxilo en su molécula, tales como ácido aspártico y ácido glutámico; un aminoácido con dos o más grupos amino en su molécula, tales como lisina, arginina, histidina y triptófano; un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en su molécula, tal como serina, treonina y tirosina; un aminoácido que tiene un grupo tiol en su molécula, tal como cisteína; o un aminoácido con un grupo amida en su molécula, tal como asparagina y glutamina. En concreto, desde la perspectiva de la reactividad, se prefiere ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, serina, treonina, cisteína, asparagina o glutamina.

[0046] Cuando una cadena de azúcar y un aminoácido están enlazados a través de un enlace en una glicoproteína, pueden utilizarse ampliamente sustancias empleadas en la técnica como enlace, y entre los ejemplos de las mismas, se incluye:



donde a es un número entero y, pese a que no se impone ninguna limitación particular al respecto siempre que no bloquee la función prevista del enlace, es preferiblemente un número entero de 0 a 4; C₁₋₁₀ polimetileno; y



donde R³ es un grupo producido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, un grupo de carbono cíclico, un grupo de carbono cíclico sustituido, un grupo heterocíclico y un grupo heterocíclico sustituido.

10 **[0047]** Tal como se utiliza en el presente documento, una "cadena de azúcar" abarca, además de un compuesto que consiste en una cadena de dos o más azúcares unitarios (monosacáridos y/o un derivado de los mismos), un compuesto que consiste en un único azúcar unitario (monosacárido y/o un derivado del mismo). Entre los ejemplos de dicha cadena de azúcar, se incluyen, de manera amplia, pero sin carácter limitativo, monosacáridos y polisacáridos contenidos en el cuerpo vivo (glucosa, galactosa, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, así como un complejo y un derivado de estos monosacáridos y polisacáridos)

15 y, además, un polisacárido descompuesto, una glicoproteína, proteoglicano, glicosaminoglicano y una cadena de azúcar descompuesta o derivada de una molécula biológica compleja, tal como un glicolípido. Cuando dos o más azúcares unitarios están unidos en una cadena, los azúcares unitarios están enlazados entre sí a través de condensación por deshidratación del enlace glicosido. La cadena de azúcar puede ser lineal o ramificada.

20 **[0048]** Además, tal como se utiliza en el presente documento, una "cadena de azúcar" abarca un derivado de una cadena de azúcar. Entre los ejemplos de un derivado de una cadena de azúcar, se incluye, pero sin carácter limitativo, una cadena de azúcar que tiene como azúcar constituyente de la cadena de azúcar, un azúcar que tiene un grupo carboxilo (por ejemplo, ácido aldónico que se convierte en ácido carboxílico por medio de la oxidación de la posición C-1 (por ejemplo, ácido D-glucónico resultante de la oxidación de D-glucosa), ácido urónico cuyo átomo terminal C se convierte en un ácido carboxílico (por ejemplo, ácido D-glucurónico resultante de la oxidación de D-glucosa), un azúcar que tiene un grupo amino o un derivado de un grupo amino (por ejemplo, un grupo amino acetilado) (por ejemplo, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina), un azúcar que tiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo (por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) y ácido N-acetilmurámico), un azúcar deoxilado (por ejemplo, 2-deoxi-D-ribosa), un azúcar sulfatado que contiene un grupo de ácido sulfúrico y un azúcar fosforilado que contiene un grupo fosfato.

25

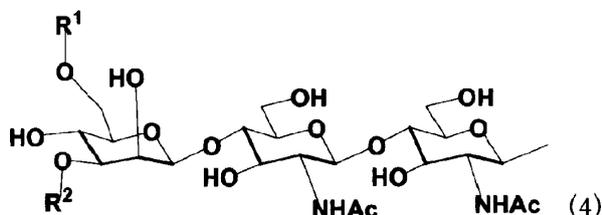
30

[0049] La cadena de azúcar de la presente invención es, preferiblemente, una cadena de azúcar que está presente como un azúcar complejo en el cuerpo vivo (tal como una glicoproteína (o un glicopéptido), un proteoglicano y un glicolípido) y, preferiblemente, una cadena de azúcar unida a N, una cadena de azúcar unida a O y similares, que son una cadena de azúcar enlazada a una proteína (o un péptido) para formar una glicoproteína (o un glicopéptido) en el cuerpo vivo. En una glicoproteína que tiene una cadena de azúcar unida a O, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), xilosa, fucosa y similares están enlazados a Ser o Thr de un péptido por medio de un enlace O-glicosídico, y se añade una cadena de azúcar también a la misma. Entre los ejemplos de una cadena de azúcar unida a N, se incluye un tipo con contenido elevado en manosa, un tipo complejo y un tipo híbrido, entre los cuales se prefiere un tipo complejo.

35

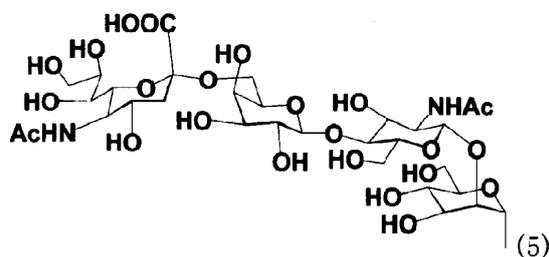
40 **[0050]** En la presente invención, un ejemplo de una cadena de azúcar preferible es una representada por la siguiente fórmula (4).

[Fórmula 1]

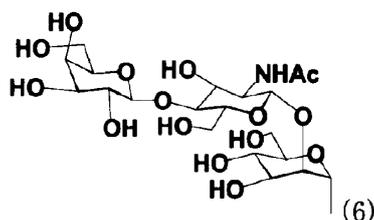


45 donde R¹ y R² son cada uno, de forma independiente, un átomo de hidrógeno o un grupo representado por las fórmulas (5) a (8).

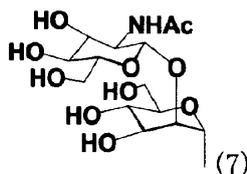
[Fórmula 2]



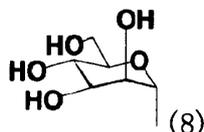
[Fórmula 3]



[Fórmula 4]



[Fórmula 5]



5

[0051] Cuando se considera la aplicación del método de producción de una glicoproteína de la presente invención al campo de la producción de un producto farmacéutico y similares, desde el punto de vista de la posible evitación de un problema de antigenicidad y similares, entre los ejemplos de una cadena de azúcar preferible, se incluye una cadena de azúcar que tiene la misma estructura que una cadena de azúcar que está enlazada a una proteína y presente como una glicoproteína en el cuerpo humano (por ejemplo, la cadena de azúcar descrita en FEBS LETTERS Vol. 50, N^o. 3, Feb. 1975) (una cadena de azúcar que tiene el mismo tipo de azúcares constituyentes y el mismo patrón de unión de estos azúcares constituyentes) o una cadena de azúcar obtenida mediante la eliminación de uno o más azúcares del extremo no reductor de la cadena de azúcar anterior.

10

15 **[0052]** No se impone ninguna limitación particular sobre el número de cadenas de azúcar que se ha de añadir en una glicoproteína siempre que sea una o más; sin embargo, desde el punto de vista de la provisión de una glicoproteína que tiene una estructura similar a una glicoproteína presente en el cuerpo vivo, el número de cadenas de azúcar que se ha de añadir puede ser más preferible si es aproximadamente el mismo número que una glicoproteína presente en el cuerpo.

20 **[0053]** En el método de producción de una glicoproteína de la presente invención, se utiliza una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes. En la presente invención, la estructura de la cadena de azúcar en una glicoproteína uniforme significa que, cuando se comparan las glicoproteínas entre sí, el sitio de adición de cadena de azúcar en un péptido, el tipo de cada azúcar constituyente de la cadena de azúcar, el orden de unión, así como el patrón de unión de los azúcares son los mismos en al menos un 90 % o más, preferiblemente un 95 % o más, más preferiblemente un 99 % o más de la cadena de azúcar.

25

[0054] Además, en la presente invención, la secuencia de aminoácidos en una glicoproteína uniforme significa que, cuando se comparan las glicoproteínas entre sí, el tipo de aminoácido en la proteína, el orden de unión, así como el patrón de unión de aminoácidos son los mismos. Sin embargo, siempre que una glicoproteína plegada tenga una actividad predeterminada, las propiedades indicadas anteriormente pueden ser las mismas en al menos un 90 % o más, preferiblemente un 95 % o más, más preferiblemente un 99 % o más de la glicoproteína.

[0055] La glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes que se ha de utilizar en la presente invención puede producirse mediante la incorporación de una etapa de adición de una cadena de azúcar a un método de producción de un péptido conocido por los expertos en la materia, tal como síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida, síntesis mediante células y un método de separación y extracción de una de origen natural. En lo que se refiere al método de producción de una cadena de azúcar para su utilización en la etapa de la adición de una cadena de azúcar, pueden consultarse, por ejemplo, los documentos de patente con los números de publicación internacional WO03/008431, WO2004/058984, WO2004/008431, WO2004/058824, WO2004/070046, WO2007/011055 y similares.

[0056] En un modo de realización preferido de la presente invención, al menos una parte de la glicoproteína que tiene aminoácido y cadena de azúcar uniformes se produce por medio del siguiente método. El folleto del documento de patente WO2004/005330 también puede consultarse en relación con el método que se muestra a continuación.

[0057] En primer lugar, (1) se esterifica un grupo hidroxilo de una resina que tiene un grupo hidroxilo con un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble. En ese caso, puesto que el grupo amino de un aminoácido se protege con un grupo protector liposoluble, se evita la autocondensación de aminoácido y la reacción de esterificación se producirá entre el grupo hidroxilo de una resina y el grupo carboxilo de un aminoácido.

[0058] A continuación, (2) el grupo protector liposoluble del éster producido en la etapa (1) se elimina para generar un grupo amino libre,

(3) se amida el grupo amino libre mencionado anteriormente con un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble,

(4) después de la etapa (3), se elimina el grupo protector liposoluble para generar un grupo amino libre, y

(5) las etapas (3) y (4) se repiten una o más veces, según sea necesario, mediante lo cual puede obtenerse una glicoproteína que tiene un número deseado de aminoácidos unidos entre sí y que tiene una o más cadenas de azúcar enlazadas a una posición deseada. Entre los ejemplos de un aminoácido glicosilado, se incluye una cadena de azúcar unida a asparagina en la que una cadena de azúcar está enlazada a nitrógeno de un grupo amida en la cadena lateral de asparagina por medio de un enlace N-glicósido y una cadena de azúcar unida a serina o una cadena de azúcar unida a treonina en la que una cadena de azúcar está enlazada a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina por medio de un enlace O-glicósido.

[0059] La glicoproteína obtenida mediante la etapa (5) está enlazada a resina en un extremo, mientras que tiene un grupo amino libre en el otro extremo. Por lo tanto, (6) puede producirse una glicoproteína deseada mediante escisión de un enlace éster formado en la etapa (1) por un ácido.

[0060] Como resina en fase sólida, puede emplearse la resina que se utiliza, por lo general, en la síntesis en fase sólida, y entre algunos ejemplos de la misma, se incluye la resina Amino-PEGA (producto de Merck), la resina de Wang (producto de Merck), la resina HMPA-PEGA (producto de Merck) y la resina de cloruro de trítulo (producto de Merck).

[0061] Además, puede haber un enlace presente entre la resina Amino-PEGA y un aminoácido, y entre los ejemplos de dicho enlace, se incluye el ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA, por sus siglas en inglés) y el ácido 4-(hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butilacético (HMPB, por sus siglas en inglés).

[0062] Entre los ejemplos de un grupo protector liposoluble, se incluye, pero sin carácter particularmente limitado, un grupo protector, tal como un grupo que contiene un grupo carbonilo, tal como un grupo 9-fluoronilmetoxicarbonil (Fmoc), un grupo t-butiloxicarbonil (Boc) y un grupo aliloxicarbonil (Alloc), un grupo acilo, tal como un grupo acetilo (Ac), un grupo alilo y un grupo bencilo.

[0063] Con el fin de introducir un grupo protector liposoluble, por ejemplo, cuando se introduce un grupo Fmoc, puede introducirse mediante la realización de reacciones con la adición de 9-fluorenilmetil-N-succinimidil carbonato e hidrogenocarbonato de sodio. La reacción anterior puede realizarse entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente entre una y cinco horas.

[0064] Como aminoácido protegido con un grupo protector liposoluble, puede utilizarse uno obtenido mediante la protección del aminoácido anteriormente mencionado mediante el método descrito anteriormente. Además,

también puede utilizarse un aminoácido disponible en el mercado. Entre los ejemplos de los mismos, se incluye Fmoc-Ser, Fmoc-Asn, Fmoc-Val, Fmoc-Leu, Fmoc-Ile, Fmoc-Ala, Fmoc-Tyr, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys, Fmoc-Arg, Fmoc-His, Fmoc-Asp, Fmoc-Glu, Fmoc-Gln, Fmoc-Thr, Fmoc-Cys, Fmoc-Met, Fmoc-Phe, Fmoc-Trp y Fmoc-Pro.

5 **[0065]** Como catalizador de esterificación, puede utilizarse un agente de condensación por deshidratación conocido, tal como 1-mesitileno-sulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), dicitlohexilcarbodiimida (DCC) y 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI). Con respecto a la proporción de un aminoácido y un agente de condensación por deshidratación utilizada, en relación con una parte en peso del primero, el segundo es normalmente una a 10 partes en peso, preferiblemente dos a cinco partes en peso.

10 **[0066]** Preferiblemente, una reacción de esterificación se lleva a cabo mediante, por ejemplo, la colocación de resina en una columna en fase sólida y el lavado de la resina con un disolvente, seguido de la adición de una solución de aminoácido. Entre los ejemplos de un disolvente para el lavado, se incluye dimetilformamida (DMF), 2-propanol y cloruro de metileno. Ejemplos de un disolvente para disolver un aminoácido incluyen dimetil sulfóxido (DMSO), DMF y cloruro de metileno. La reacción de esterificación puede realizarse entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente 10 minutos hasta 30 horas, preferiblemente 15 minutos a 24 horas.

[0067] En este momento, también es preferible limitar cualquier grupo funcional sin reaccionar en la fase sólida mediante acetilación con ácido acético anhidro y similares.

20 **[0068]** La eliminación de un grupo protector liposoluble puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, tratamiento con una base. Ejemplos de una base incluyen piperidina y morfolina. En este momento, la reacción se lleva a cabo, preferiblemente, en presencia de un disolvente. Ejemplos de un disolvente incluyen DMSO, DMF y metanol.

[0069] Una reacción de amidación de un grupo amino libre y un grupo carboxilo de cualquier aminoácido donde el nitrógeno del grupo amino se protege con un grupo protector liposoluble se lleva a cabo, preferiblemente, en presente de un activador y un disolvente.

25 **[0070]** Ejemplos de un activador incluyen dicitlohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida clorhidrato (WSC/HCl), difenilfosforil azida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), dietil cianofosfonato (DEPC), 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPCI), benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP), 3-dietoxifosforiloxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hidroxisuccinimida (HOSu), dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAt), 3-hidroxí-4-oxo-3,4-dihidro-5-azabenzo-1,2,3-triazina (HODhbt), hidroxifalimida (HOPht), pentafluorofenol (Pfp-OH), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfonato (HATU) y O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU).

35 **[0071]** El activador se utiliza, preferiblemente, en una cantidad de uno a 20 equivalentes, preferiblemente uno a 10 equivalentes, más preferiblemente uno a cinco equivalentes en relación con cualquier aminoácido en el que el nitrógeno del grupo amino está protegido con un grupo protector liposoluble.

40 **[0072]** Si bien las reacciones se llevan a cabo mediante la utilización solamente de los activadores anteriormente mencionados, la amina se utiliza preferiblemente en combinación como un agente complementario. Ejemplos de amina incluyen diisopropiletilamina (DIPEA), N-etilmorfolina (NEM), N-metilmorfolina (NMM) y N-metilimidazol (NMI). El agente complementario se utiliza, preferiblemente, en una cantidad de uno a 20 equivalentes, preferiblemente uno a 10 equivalentes, más preferiblemente uno a cinco equivalentes en relación con cualquier aminoácido en el que el nitrógeno del grupo amino está protegido con un grupo protector liposoluble.

45 **[0073]** Ejemplos de un disolvente incluyen DMSO, DMF y cloruro de metileno. La reacción puede realizarse entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente 10 minutos hasta 30 horas, preferiblemente aproximadamente 15 minutos a 24 horas. Asimismo, en este momento, es preferible limitar cualquier grupo amino sin reaccionar en la fase sólida mediante acetilación con ácido acético anhidro y similares. El grupo protector liposoluble puede eliminarse de una manera similar a la que se indica anteriormente.

50 **[0074]** La escisión de una cadena peptídica de la resina se procesa, preferiblemente, con un ácido. Ejemplos de un ácido incluyen ácido trifluoroacético (TFA) y fluoruro de hidrógeno (HF). En este momento, un enlace entre el grupo protector liposoluble en un aminoácido y resina puede producir una especie catiónica muy reactiva. Por lo tanto, con el fin de capturar dicha especie catiónica, se añade, preferiblemente, un reactivo nucleofílico. Ejemplos de un reactivo nucleofílico incluyen triisopropilsilano (TIS), fenol, tioanisol, y etanodiol (EDT).

55 **[0075]** Una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes puede producirse de la siguiente manera: dividiéndola en diversos bloques peptídicos o bloques glicopeptídicos y sintetizando cada bloque por medio de las etapas (1) a (6) y, a continuación, uniendo los bloques así sintetizados entre sí mediante el método de ligación.

- 5 **[0076]** Tal como se utiliza en el presente documento, el "método de ligación" abarca la ligación química nativa (NCL) como se describe en el documento de patente con número de publicación internacional WO96/34878 y también abarca la aplicación de ligación química nativa a un péptido que incluye aminoácidos de origen no natural y derivados de aminoácido. De acuerdo con el método de ligación, puede producirse una proteína que tiene un enlace amida natural (enlace peptídico) en el sitio de unión.
- [0077]** La unión mediante ligación puede aplicarse para el enlace entre cualquiera de péptido-péptido, péptido-glicopéptido y glicopéptido-glicopéptido; sin embargo, es necesario que uno de dos péptidos o glicopeptidos que se han de unir tenga un residuo de cisteína en su extremo N-terminal y el otro tenga una fracción α -carboxitioéster en su extremo C-terminal.
- 10 **[0078]** Con el fin de que cada péptido o glicopeptidos tenga un residuo de cisteína en su extremo N-terminal, por ejemplo, cuando se diseña cada bloque peptídico o glicopeptídico, la división puede realizarse en el lado N-terminal de un residuo de cisteína contenido en una glicoproteína que se ha de producir como producto final.
- [0079]** Un péptido o glicopéptido que tiene una fracción α -carboxitioéster en su extremo C-terminal puede producirse mediante el método conocido por los expertos en la materia, tal como el método descrito en el documento de patente con el número de publicación internacional WO96/34878.
- 15 **[0080]** Por ejemplo, como se describirá en los ejemplos más adelante, un péptido (o glicopeptido) protegido en el que están protegidos la cadena lateral de aminoácidos y el aminoácido en el extremo N-terminal, se obtiene mediante el método de síntesis en fase sólida y el grupo carboxilo en el extremo C-terminal de este péptido (o glicopéptido) protegido se condensa mediante mercaptano bencílico en una fase líquida, mediante la utilización de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato (PyBOP)/DIPEA como agente de condensación y, a continuación, el péptido (o glicopéptidos) resultante se desprotege mediante la utilización de solución de TFA al 95 %, por medio de lo cual se puede obtener un péptido (o glicopéptido) que tiene un α -carboxitioéster en su extremo C-terminal.
- 20 **[0081]** El método de ligación puede llevarse a cabo mediante el método conocido por los expertos en la materia, tal como el método descrito en la literatura de patente 1 o relativo a la descripción de ejemplos que se presentan más adelante. Por ejemplo, un primer péptido que tiene una fracción α -carboxitioéster representada por $-C(=O)-SR$ en su extremo C-terminal y un segundo péptido que tiene un residuo de aminoácido que tiene un grupo $-SH$ en su extremo N-terminal se preparan en referencia a la descripción mencionada anteriormente. Si bien no se impone ninguna limitación particular en R en el primer péptido siempre que no bloquee una reacción de intercambio de tiol y se convierta en un grupo saliente en una reacción de sustitución nucleofílica llevada a cabo en el grupo carbonilo, se selecciona, preferiblemente, entre un tipo bencilo, tal como mercaptano bencílico, un tipo arilo, tal como trifenol, 4-(carboximetil)-tiofenol, un tipo alquilo, tal como 2-mercaptoetanosulfonato y 3-mercaptopropionamida y similares. Además, si bien el grupo $-SH$ en el extremo N-terminal del segundo péptido puede estar protegido con un grupo protector como se desee, este grupo protector se elimina en un punto deseado en la reacción antes de que lleve a cabo la reacción de ligación descrita a continuación, y el segundo péptido que tiene un grupo $-SH$ en su extremo N-terminal reacciona con el primer péptido. Por ejemplo, cuando un grupo protector es uno que se eliminará naturalmente en las condiciones en que se produce la ligación, tal como un grupo disulfuro, el segundo péptido protegido con un grupo protector puede utilizarse tal cual en la siguiente reacción de ligación.
- 25 **[0082]** Estos dos péptidos se mezclan en una solución tal como un tampón fosfato 100 nM en presencia de tiol catalítico, tal como ácido 4-mercaptofenil acético, mercaptano bencílico y tiofenol. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en la proporción de 0,5 a dos equivalentes del segundo péptido y cinco equivalentes de tiol catalítico en relación con un equivalente del primer péptido. La reacción se lleva a cabo, preferiblemente, en las condiciones de un pH de aproximadamente 6,5 a 7,5 y una temperatura de aproximadamente 20 a 40 °C durante aproximadamente una y 30 horas. El progreso de la reacción puede confirmarse mediante una técnica conocida de una combinación de HPLC, MS y similares.
- 30 **[0083]** A la reacción anterior, se le añade un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) y tris(2-carboxietil)fosfina clorhidrato (TCEP) para moderar una reacción secundaria y el producto resultante se somete a purificación si se desea, mediante lo cual pueden unirse el primer péptido y el segundo péptido.
- 35 **[0084]** Cuando el péptido que tiene una fracción carboxitioéster ($-C(=O)-SR$) en su extremo C-terminal tiene distintos grupos R, el orden de la reacción de ligación puede manipularse (véase Protein Science (2007), 16: 2056-2064 y similares), lo que puede tenerse en cuenta cuando la ligación se lleva a cabo varias veces. Por ejemplo, cuando un grupo arilo, un grupo bencilo y un grupo alquilo están presentes como R, la reacción de ligación, por lo general, se desarrolla en este orden.
- 40 **[0085]** Tal como se utiliza en el presente documento, la "estructura de orden superior" de una proteína se refiere a una conformación de una proteína que abarca la estructura secundaria, tal como una estructura hélice α y lámina β o una estructura tal como un enrollamiento al azar, la estructura terciaria en la que la estructura secundaria está plegada espacialmente mediante un enlace de hidrógeno, un enlace disulfuro, un enlace iónico,
- 45
- 50
- 55

una interacción hidrofóbica y similares con el fin de formar una conformación estable, y la estructura cuaternaria, que se forma mediante unión de una pluralidad de cadenas polipeptídicas como subunidades. La estructura de orden superior de una proteína es, preferiblemente, una estructura necesaria para que la proteína presente su función en el cuerpo vivo. La estructura de orden superior de una proteína puede analizarse mediante

5

[0086] Tal como se utiliza en el presente documento, glicoproteína que tiene estructura de orden superior uniforme significa que, cuando se compara entre la glicoproteína, la estructura de orden superior de la fracción de proteína de la glicoproteína es sustancialmente la misma. La estructura de orden superior que es sustancialmente la misma significa que al menos un 90 % o más, preferiblemente un 95 % o más, más preferiblemente un 99 % o más de la estructura es uniforme. La glicoproteína que tiene estructura de orden superior uniforme tiene calidad estable y, en consecuencia, es preferible, en particular, en un campo tal como la producción de producto farmacéutico y el ensayo. El hecho de que la estructura de orden superior de una glicoproteína contenida en una fracción arbitraria sea uniforme o no puede confirmarse mediante, por ejemplo, un análisis de RMN, una medición de CD y mapeo de disulfuro.

10

15

[0087] Tal como se utiliza en el presente documento, el "plegado" significa que la fracción de proteína de una glicoproteína se pliega en una estructura de orden superior específica. Si bien los expertos en la materia pueden llevar a cabo de manera adecuada el plegado de una glicoproteína mediante un método conocido o un método equivalente, ejemplos de un método de este tipo incluyen el método de diálisis, el método de dilución y el método de inactivación. El método de diálisis es un método para plegar un péptido en una estructura de orden superior predeterminada en el que se añade con antelación un agente de desnaturalización de proteínas (agente de despliegue), después de lo cual la mezcla resultante se diluye gradualmente mediante diálisis con el fin de que se sustituya por un tampón y similares. Ejemplos de un agente de despliegue incluyen clorhidrato de guanidina y urea. Además, el método de dilución es un método para plegar un péptido en una estructura de orden superior en el que, tras la adición de un agente de desnaturalización de proteínas, la mezcla resultante se diluye mediante un tampón y similares de manera gradual o a la vez. El método de inactivación es un método para plegar un péptido en una estructura de orden superior en el que, tras la adición de un agente de desnaturalización de proteínas, un segundo agente que inactiva el agente de desnaturalización se añade de manera gradual o a la vez.

20

25

30

[0088] En la presente invención, la "actividad fisiológica predeterminada" puede seleccionarse entre actividades fisiológicas de una glicoproteína que tiene una estructura de orden superior que se obtiene con buena reproducibilidad con una proporción constante cuando se pliega. Dicha actividad fisiológica puede obtenerse mediante el plegado de una glicoproteína diana con antelación mediante un método similar a las etapas (a) y (b) que se describen más adelante y fraccionándola mediante cromatografía en columna y recogiendo el eluyente correspondiente al pico principal y, a continuación, midiendo la actividad fisiológica de la glicoproteína contenida en esa fracción. Aquí, el pico principal significa un pico obtenido con buena reproducibilidad cuando las etapas (a) y (b) se llevan a cabo repetidamente. La actividad fisiológica puede medirse mediante un método conocido por los expertos en la materia en función de la glicoproteína diana.

35

40

[0089] En el "método para producir una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior", de acuerdo con la presente invención, en primer lugar, en la etapa (a), se pliega una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes. En la solución que contiene la glicoproteína plegada, está presente una mezcla de glicoproteínas con diferentes estructuras de orden superior, que contiene unas con o sin una actividad predeterminada.

45

50

[0090] A continuación, en la etapa (b), la glicoproteína plegada se fracciona mediante cromatografía en columna. Si bien no se impone ninguna limitación en particular en lo que se refiere a la cromatografía en columna siempre que pueda separar una glicoproteína que tiene estructura de orden superior distinta, puede utilizarse, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Si bien los expertos en la materia pueden seleccionar, de forma adecuada, las condiciones, tal como el tipo de fase sólida y de fase móvil, así como la tasa de escape de cromatografía en columna según la glicoproteína que se ha de separar, puede utilizarse, por ejemplo, cromatografía con inversión de fase de tipo ODS, cromatografía en fase normal, columna de afinidad, columna de filtración de gel, columna de intercambio de iones y similares.

[0091] En la etapa (c), se mide la actividad de la glicoproteína contenida en cada una de las fracciones del eluido de la cromatografía en columna y se recoge una fracción que tiene una actividad predeterminada, por medio de lo cual puede obtenerse la glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior.

55

[0092] De forma alternativa, el método de producción de glicoproteína de la presente invención incluye, preferiblemente, después de la etapa (c), (d) desplegar la glicoproteína contenida en una fracción que no se ha recogido en la etapa mencionada anteriormente (c),

(e) volver a plegar la glicoproteína desplegada;

(f) fraccionar la glicoproteína que se ha vuelto a plegar mediante cromatografía en columna y recoger una fracción que tiene la actividad deseada mencionada anteriormente; y
 (g) repetir las etapas (d) a (f) según sea necesario.

5 **[0093]** La fracción que contiene la glicoproteína que se ha de desplegar en la etapa (d) también contiene una estructura de orden superior que carece de una actividad predeterminada. Además, puesto que una fracción que contiene una mezcla de dos o más tipos de glicoproteínas que tiene una actividad predeterminada no presenta un nivel predeterminado de actividad tampoco, dicha fracción también se incluye en la fracción que se ha de someter a despliegue.

10 **[0094]** Si bien la glicoproteína puede desplegarse mediante un método conocido por los expertos en la materia, ejemplos de dicho método incluyen un método de adición de un agente de despliegue (agente de desnaturalización de proteínas), tal como clorhidrato de guanidina y urea, y un método de adición, además del agente mencionado anteriormente, un agente reductor, tal como ditiotreitól (DTT) y mercaptoetanol.

[0095] Las etapas (e) y (f) pueden llevarse a cabo mediante un método similar al de las etapas anteriormente mencionadas (a) a (c).

15 **[0096]** Como se ha descrito anteriormente, mediante la realización de las etapas (d) a (f), la glicoproteína contenida en una fracción que carece de una actividad predeterminada se despliega una vez y, a continuación, se vuelve a plegar, por medio de lo cual la glicoproteína puede, posiblemente, convertirse en una estructura de orden superior que tiene una actividad predeterminada con una proporción constante. De esta manera, la glicoproteína con una estructura de orden superior que tiene una actividad predeterminada puede recogerse al
 20 máximo.

[0097] "Un método para la selección de una glicoproteína" según la presente invención incluye (i) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes,

(ii) fraccionar la glicoproteína plegada mediante cromatografía en columna, y

25 (iii) medir una actividad de cada una de las fracciones para determinar si tiene o no una actividad predeterminada.

[0098] Las etapas (i) y (ii) pueden llevarse a cabo de manera similar a las etapas mencionadas anteriormente (a) y (b). Tal y como se ha descrito anteriormente, en la solución que contiene la glicoproteína plegada que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes, está presente una mezcla de glicoproteínas con diversas estructuras de orden superior. Por consiguiente, después del fraccionamiento mediante cromatografía
 30 en columna, se mide la actividad de cada una de las fracciones para determinar si tiene o no una actividad predeterminada, por medio de lo cual solamente puede seleccionarse y purificarse la glicoproteína que tiene estructura de orden superior uniforme y que presenta una actividad fisiológica predeterminada.

[0099] La presente invención también da a conocer un método para obtener una mezcla de glicoproteínas que tiene una actividad fisiológica deseada. Este método incluye (A) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de
 35 aminoácidos y cadena de azúcar uniformes,

(B) fraccionar la glicoproteína plegada mediante cromatografía en columna,

(C) medir una actividad de cada una de las fracciones, y

(D) determinar una proporción de mezcla de las fracciones con la que puede obtenerse una actividad deseada y mezclar las fracciones de acuerdo con la proporción así obtenida.

40 **[0100]** Las etapas (A) y (B) pueden llevarse a cabo de manera similar a las etapas mencionadas anteriormente (a) y (b). Las etapas (A) y (B) proporcionan una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior y que tiene una actividad predeterminada. En consecuencia, la glicoproteína puede mezclarse con una proporción predeterminada para obtener una mezcla de glicoproteínas que tiene una actividad predeterminada.

45 **[0101]** Los términos que se utilizan en el presente documento se presentan con el fin de explicar un modo de realización específico sin intención de limitar la invención.

[0102] Asimismo, salvo que el contexto requiera que sea claramente de otro modo, los términos "comprender, contener, incluir o abarcar" como se utilizan en el presente documento, se refieren a la presencia de un asunto descrito (un miembro, una etapa, un factor, un número y similares) y estos términos no excluyen la presencia de
 50 otros asuntos (un miembro, una etapa, un factor, un número y similares).

[0103] Salvo que no haya ninguna definición alternativa, todos los términos utilizados en el presente documento (incluidos los términos técnicos y los términos científicos) tienen el mismo significado que el que entienden ampliamente los expertos en la materia a la que se refiere la presente invención. Salvo que no se indique claramente una definición alternativa, los términos utilizados en el presente documento deberían interpretarse

con el significado que es coherente con el significado de la presente memoria descriptiva y un campo técnico relevante, pero no deberían ni idealizarse ni interpretarse en el sentido excesivamente formalizado.

5 **[0104]** El modo de realización de la presente invención puede explicarse en relación con un diagrama esquemático; sin embargo, en el caso de un diagrama esquemático, el diagrama puede presentarse de manera exagerada, de manera que se explique claramente la invención.

[0105] Si bien los términos como primer y segundo se utilizan para expresar diversos factores, debe entenderse que dichos términos no limitan estos factores. Estos términos se utilizan únicamente para distinguir un factor de otro y, por ejemplo, es posible describir un primer factor como un segundo factor y, de manera similar, describir un segundo factor como un primer factor sin desviarse del alcance de la presente invención.

10 **[0106]** A continuación, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a los ejemplos.

[Ejemplos]

<Ejemplo 1> Síntesis química del tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado (en adelante, puede denominarse OMSVP3)

15 1. Síntesis química del tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes

[0107] Se sintetizaron tres fragmentos, como se muestra en la figura 1 y, a continuación, se ligaron mediante NCL para sintetizar un tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes. Los fragmentos 1 a 3 se muestran en las figuras 2 a 4.

[Instrumentos utilizados]

20 **[0108]** ¹H-RMN se midió mediante AVANCE 600 (msotrado como 600 MHz) de Bruker Corporation. Para la medición del espectro de masa ESI, se utilizó Esquire 3000 plus. de Brucker Daltonics Corporation.

[0109] Para la medición del espectro CD, se utilizaron J-820 y J-805 de JASCO Corporation.

25 **[0110]** Como instrumento analítico de RP-HPLC, se utilizó uno fabricado por Waters Corporation y como detector de UV, se utilizó Waters 486, un detector de arreglo de fotodiodos (Waters 2996) y Waters 2487, todos fueron fabricados por Waters Corporation, y como columna se utilizó columna Cadenza (Imtakt Corp., 3 μm, 4,6 × 75 mm), VydacC-18 (5 μm, 4,6 × 250 mm, 10 × 250 mm), Vydac-8 (5 μm, 10 × 250 mm) y VydacC-4 (5 μm, 4,6 × 250 mm).

[Síntesis del fragmento 1]

30 **[0111]** En una columna de síntesis en fase sólida, se colocó 2-clorotritil resina (143 mg, 200 μmol), que se lavó suficientemente, a continuación, con cloruro de metileno (DCM). Se preparó, por separado, DCM (1,2 mL) con Fmoc-Leu (212,1 mg, 0,6 mmol) y DIPEA (272,1 μL, 1,6 mmol) disuelta en el mismo y se vertió en la columna de síntesis en fase sólida cargada con la resina y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, la resina se lavó con DCM: MeOH: DIPEA = 17 : 2: 1, DCM y DMF. Posteriormente, se desprotegió el grupo Fmoc con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF y se confirmó la reacción con el ensayo Kaiser. Posteriormente, se llevó a cabo la extensión de cadena peptídica mediante la condensación secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación.

40 **[0112]** Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (135,1 mg, 1 mmol) y DIPCl (153,9 μL, 1 mmol) en DMF (4 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante una hora. Después de remover, la resina se lavó con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Pro, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Met, Fmoc-Thr(tBu),
45 Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Ala, Fmoc-Pro, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Ala y Fmoc-Ala, y como último aminoácido, se utilizó Boc-Leu-OH·H₂O (249,3 mg, 1 mmol), del que se puede eliminar un grupo protector con un ácido. En la resina de fase sólida, se obtuvo un péptido de 23 residuos que tiene un grupo protector de Boc-Leu-Ala-Ala-Val-Ser(tBu)-Val-Asp(OtBu)-Cys(Trt)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Pro-Lys(Boc)-Pro-Ala-
50 Cys(Trt)-Thr(tBu)-Met-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Leu (SEQ ID NO:1). Al péptido resultante, se le añadió AcOH: DCM: MeOH = 5: 4: 1 (2 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante tres horas. Después de remover, se eliminó la resina por filtración y se lavó con MeOH. El filtrado se añadió a hexano preparado por separado para la cristalización. Después de la filtración, el cristal así obtenido se sometió a

azeotrópico con una cantidad excesiva de benceno tres veces y, a continuación, el péptido resultante se liofilizó (figura 5, parte superior. Nota: la medición se realizó tras la desprotección).

5 **[0113]** El péptido así obtenido (un péptido de 23 residuos que tiene un grupo protector, como se muestra en SEQ ID NO:1) (39 mg, 10 μ mol), MS4A, mercaptano bencílico (35,5 μ L, 0,3 mmol) se removieron en un disolvente
 10 DMF (1,35 mL) bajo un chorro de argón a -20 °C durante una hora. Posteriormente, se añadió PyBOP (26 mg, 50 μ mol) y DIPEA (8,5 μ L, 50 μ mol) a la mezcla resultante y, a continuación, se removió durante dos horas. Después de remover, se añadió una cantidad excesiva de éter dietílico a la solución de reacción para precipitar un compuesto, seguido de filtración. Posteriormente, el precipitado así obtenido se disolvió en DMF. La solución resultante se concentró a presión reducida, a la que se añadió una solución de TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y H₂O al 2,5 % (1 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas (figura 5, en el medio). La solución de reacción resultante se concentró a presión reducida y, a continuación, se purificó mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 x 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) para producir un péptido de 23 residuos que
 15 tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, que es Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-A la-Cys-Thr-Met-Glu-Tyr-Arg-Pro-Leu-SBn (SEQ ID NO:2) (figura 5, parte inferior).

ESI-MS: Calculado para C₁₁₈H₁₈₁N₂₇O₃₄S₄: [M+2H]²⁺ 1326,0. Encontrado: 1325,8

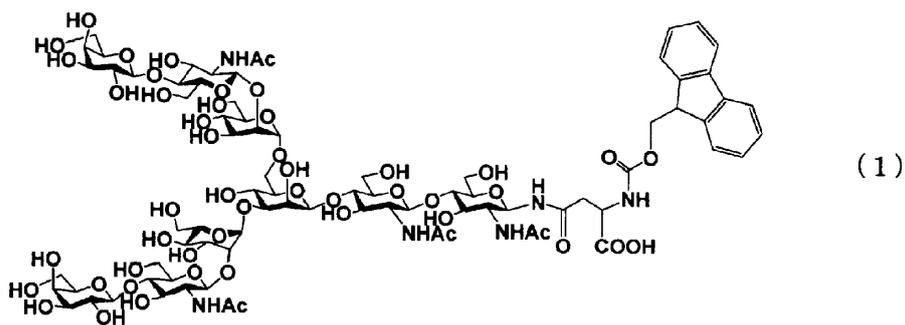
[Síntesis del fragmento 2]

20 **[0114]** Posteriormente, en una columna de síntesis sólida separada, se colocó resina Amino-PEGA (producto de Merck) (1 g, 50 μ mol), que se lavó suficientemente con cloruro de metileno (DCM) y DMF. La resina resultante se hinchó suficientemente en DMF. A continuación, se disolvió ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutírico (HMPB) (0,125 mmol), TBTU (0,125 mmol) y N-etilmorfolina (0,125 mmol) en DMF (1 ml) y la mezcla resultante se vertió en la columna y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. La resina se lavó suficientemente con DMF y DCM y la reacción se confirmó con el ensayo Kaiser. Se confirmó que la resina era
 25 negativa (-) mediante el ensayo Kaiser y se hinchó en DCM durante una hora. Se obtuvo resina HMPB-PEGA, que se utilizó como soporte sólido para la síntesis en fase sólida.

[0115] Se disolvió Fmoc-Phe (96,9 mg, 0,25 mmol), MSNT (74 mg, 0,25 mmol) y N-metilimidazol (14,9 μ L, 0,188 mmol) en DCM (1 mL) y la mezcla resultante se vertió en una columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF, y se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF y se confirmó la reacción con el ensayo Kaiser. Posteriormente, se llevó a cabo la extensión de cadena peptídica mediante la condensación de manera secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación.

35 **[0116]** Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (33,8 mg, 0,25 mmol) y DIPCI (38,5 μ L, 0,25 mmol) en DMF (1 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante una hora. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Asn, Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asn, Fmoc-Gly, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Thr(tBu) y Fmoc-Lys(Boc) y se obtuvo un péptido de 9 residuos que tiene un grupo protector que es Fmoc-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-Asn-Lys(Boc)-Cys(Trt) -Asn-Phe (SEQ ID NO:3) en la resina de fase sólida. A continuación, se transfirieron 3 μ mol de equivalente del péptido de 9 residuos en la resina de fase sólida a otra columna de síntesis en fase sólida y se desprotegió el grupo Fmoc con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. Se lavó suficientemente la resina con DMF y se transfirió a un tubo Eppendorf. Posteriormente, se disolvió una cadena de azúcar unida a asparagina representada por la siguiente fórmula (1) (12 mg, 6 μ mol) y DEPBT (3 mg, 10 μ mol) en 0,20 mL de DMF: DMSO = 4: 1, y se transfirió la mezcla resultante al tubo Eppendorf. A este tubo, se le añadió DIPEA (1,02 μ L, 6 μ mol) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante 20 horas.

50 [Fórmula 6]



[0117] Después de remover, se transfirió la resina a una columna de síntesis en fase sólida y se lavó con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF. Posteriormente, se llevó a cabo la extensión de cadena glicopeptídica mediante la condensación secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación. Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (2 mg, 0,015 mmol) y DIPCI (2,3 μ L, 0,015 mmol) en DMF (0,375 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Gly y Boc-Cys(Thz) (Thz) y se obtuvo un péptido glicosilado de 14 residuos que tiene un grupo protector que es Boc-Cys(Thz)-Gly-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Asn(Oligosacárido)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Gly-Asn-Lys(Boc)-Cys(Trt)-Asn-Phe (SEQ ID NO:4) en la resina de fase sólida. Al péptido glicosilado, se le añadió 1 mL de ácido acético: trifluoroetanol (= 1: 1) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante 20 horas. Se eliminó la resina por filtración y se lavó con MeOH, y se concentró el filtrado a presión reducida. El filtrado concentrado se sometió a azeotrópico con benceno tres veces. Se disolvió el residuo así obtenido y, a continuación, se liofilizó (figura 6, parte superior. Nota: la medición se realizó tras la desprotección).

[0118] El péptido así obtenido (un péptido glicosilado de 14 residuos que tiene un grupo protector, como se muestra en SEQ ID NO:4) (11,7 mg, 3 μ mol), MS4A (10 mg) y mercaptano bencilico (10,6 μ L, 0,09 mmol) se removió en un disolvente DMF (0,41 mL) bajo un chorro de argón a -20 °C durante una hora. Posteriormente, se añadió PyBOP (7,8 mg, 15 μ mol) y DIPEA (2,6 μ L, 15 μ mol) a la mezcla resultante y, a continuación, se removió durante dos horas. Después de remover, se añadió una cantidad excesiva de éter dietílico a la solución de reacción para precipitar un compuesto, seguido de filtración. Posteriormente, el precipitado así obtenido se disolvió en DMF. La solución resultante se concentró a presión reducida, a la que se añadió una solución de TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y H₂O al 2,5 % (1 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas (figura 6, en el medio). La solución de reacción resultante se concentró a presión reducida y, a continuación, se purificó mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 15 minutos, un caudal de 1,0 mL/min) para producir un péptido glicosilado de 14 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, que es Cys(Thz)-Gly-Ser-Asp-Asn(Oligosacárido)-Lys-Thr-Tyr-Gly -Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-SBn (SEQ ID NO:5) (figura 6, parte inferior).

ESI-MS: Calculado para C₁₃₃H₂₀₃N₂₃O₆₇S₃: [M+2H]²⁺ 1647,1. Encontrado: 1646,6

[Síntesis del fragmento 3]

[0119] En una columna de síntesis en fase sólida, se colocó 2-clorotritil resina (200 μ mol), que se lavó suficientemente, a continuación, con cloruro de metileno (DCM). Se preparó, por separado, DCM (1,2 mL) con Fmoc-Cys(Trt) (351,4 mg, 0,6 mmol) y DIPEA (272,1 μ L, 1,6 mmol) disuelta en el mismo y se vertió en la columna de síntesis en fase sólida cargada con la resina y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, la resina se lavó con DCM: MeOH: DIPEA = 17: 2: 1, DCM y DMF. Posteriormente, se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF y se confirmó la reacción con el ensayo Kaiser. Posteriormente, la extensión de cadena peptídica se llevó a cabo mediante la condensación secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación.

[0120] Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (135,1 mg, 1 mmol) y DIPCI (153,9 μ L, 1 mmol) en DMF (4 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante una hora. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un

grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gly, Fmoc-Phe, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Gly, Fmoc-Asn, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Val, Fmoc-Val, Fmoc-Ala, Fmoc-Asn y Fmoc-Cys(Trt) y se obtuvo un péptido de 19 residuos que tiene un grupo protector que es Cys(Trt)-Asn-Ala-Val-Val-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Asn-Gly-Thr(t Bu) -Leu-Thr (tBu) -Leu-Ser (tBu) -His (Trt) -Phe-Gly-Lys (Boc) -C ys (Trt) (SEQ ID NO: 6) en la resina de fase sólida. Al péptido, se le añadió una solución de TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y H₂O al 2,5 % (3 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se eliminó la resina por filtración y se concentró el filtrado a presión reducida (figura 7, parte superior). Se purificó el filtrado concentrado mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) para producir un péptido de 19 residuos, que es Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-H is-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:7) (figura 7, parte inferior). ESI-MS: Calculado para C₈₃H₁₃₄N₂₄O₂₈S₂: [M+2H]²⁺ 991,1. Encontrado: 991,0

[Ligación de fragmentos 2 y 3 mediante NCL]

15 **[0121]** Se colocaron en el mismo tubo Eppendorf dos tipos de péptidos, a saber, 1,9 mg (1 μmol) del fragmento 3 (un péptido de 19 residuos, como se muestra en SEQ ID NO: 7) y 3,2 mg (1 μmol) del fragmento 2 (un péptido glicosilado de 14 residuos con un grupo protector que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en la figura 5) y se disolvieron en 485 μL de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 6M). Posteriormente, se añadió tiofenol (15 μL) a la mezcla resultante a 25 °C y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente (0 h en la figura 8). Después de 24 horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC (24 h en la figura 8). Posteriormente, se purificó la solución de reacción mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) (figura 8, tras la purificación). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido glicosilado de 33 residuos que tiene un grupo protector, que es Cys(Thz)-Gly-Ser-Asp-Asn(Oligosacárido)-Lys-Thr-Tyr-Gly -Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:8). ESI-MS: Calculado para C₂₀₉H₃₂₉N₄₇O₉₅S₄: [M+4H]⁴⁺ 1287,28. Encontrado: 1287,6

30 **[0122]** El péptido así obtenido (un péptido glicosilado de 33 residuos que tiene un grupo protector, como se muestra en SEQ ID NO:8) se disolvió en una solución acuosa 0,2 M de metoxiamina (pH = 4,0). Después de cuatro horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC y se purificó el producto resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) (figura 8, desprotección de tiazolinol). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido glicosilado de 33 residuos, que es Cys-Gly-Ser-Asp-Asn(Oligosacárido)-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:9). ESI-MS: Calculado para C₂₀₈H₃₂₉N₄₇O₉₅S₄: [M+4H]⁴⁺ 1284,28. Encontrado: 1284,5

40 **[0123]** El péptido glicosilado de 33 residuos, como se muestra en SEQ ID NO:9 se obtuvo, de manera similar, también en las siguientes condiciones.

45 **[0124]** Se colocaron dos tipos de péptidos, a saber, 1,9 mg (1 μmol) del fragmento 3 (un péptido de 19 residuos, como se muestra en SEQ ID NO: 7) y 3,2 mg (1 μmol) del fragmento 2 (un péptido glicosilado de 14 residuos que tiene un grupo protector y un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en la figura 5) en tubos Eppendorf por separado y se disolvieron en 247,5 μL de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 6M). A continuación, se combinó el contenido en un tubo Eppendorf. Posteriormente, se añadió tiofenol al 1 % (5 μL) a la mezcla resultante a 25 °C y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente. A la reacción, le siguió HPLC y espectrometría de masas, y se confirmó la desaparición del fragmento 3 mediante HPLC tras siete horas. Después, se añadió una solución acuosa 0,2 M de metoxiamina para que el pH del sistema fuera aproximadamente 4 para desproteger el extremo N-terminal Cys. Después de seis horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante espectrometría de masas y se purificó la solución de reacción resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido glicosilado de 33 residuos, como se muestra en SEQ ID NO:9. ESI-MS: Calculado para C₂₀₈H₃₂₉N₄₇O₉₅S₄: [M+4H]⁴⁺ 1284,28. Encontrado: 1284,5

[Ligación del fragmento 1 y fragmentos 2 y 3 mediante NCL]

[0125] Se colocaron dos tipos de péptidos en el mismo tubo Eppendorf, a saber 1,3 mg (0,25 μmol) del péptido glicosilado de 33 residuos preparado mediante la ligación de los fragmentos 2 y 3, y 1,3 mg (0,50 μmol) del fragmento 1 (un péptido de 23 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra

en SEQ ID NO:2) y se disolvieron en 485 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 8 M). Posteriormente, se añadió tiofenol (15 μ L) a la mezcla resultante a 25 °C y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente (0 h en la figura 9). Después de 54 horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC (54 h en la figura 9). Posteriormente, se purificó la solución de reacción mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) (figura 9, parte inferior). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido glicosilado de 56 residuos de Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Cys-Thr-Met-Glu-Tyr-Arg-Pro-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Asn(Oligosacárido)-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:10).
ESI-MS: Calculado para C₃₁₉H₅₀₂N₇₄O₁₂₉S₇: [M+5H]⁵⁺ 1532,46. Encontrado: 1532,7

[0126] El péptido glicosilado de 56 residuos (SEQ ID NO:10) se obtuvo, de manera similar, también en las siguientes condiciones.

15 **[0127]** Se colocaron dos tipos de péptidos en tubos Eppendorf por separado, a saber 1,3 mg (0,25 μ mol) del péptido glicosilado de 33 residuos, como se muestra en SEQ ID NO:9, y 1,3 mg (0,50 μ mol) del fragmento 1 (el péptido de 23 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO:2) y se disolvieron en 247,5 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 8 M). A continuación, se combinó el contenido en un tubo Eppendorf. A la reacción, le siguió HPLC y espectrometría de masas y, después de 30 horas, se purificó la solución de reacción resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min).

[Plegado de glicoproteína]

25 **[0128]** En un tubo Eppendorf, se transfirieron 0,5 mg (65,2 nmol) del péptido glicosilado de 56 residuos (SEQ ID NO:10) preparado como se describe anteriormente que, a continuación, se disolvió en 100 μ L de tampón tris 0,6 M (pH = 8,7, que contiene clorhidrato de guanidina 0,6 M y EDTA 6 mM). Se diluyó la mezcla resultante con 500 μ L de agua destilada para plegar el tercer dominio de ovomucoide glicosilado.

[Fraccionamiento mediante HPLC]

30 **[0129]** Después de 36 horas, se confirmó el progreso de la reacción mediante HPLC y espectrometría de masas y se purificó el producto resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Como consecuencia, se obtuvieron cuatro fracciones A a D que contenían el péptido glicosilado de 56 residuos que tenía una estructura de orden superior de Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Cys-Thr-Met-Glu-Tyr-Arg-Pro-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Asn(Oligosacárido)-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:10) (figura 10).

40 ESI-MS: Calculado para C₃₁₉H₅₀₂N₇₄O₁₂₉S₇: [M+5H]⁵⁺ 1532,2, [M+4H]⁴⁺ 1915,0, [M+3H]³⁺ 2553,0,
A; Encontrado: 1532,5; 1915,2; 2553,2
B; Encontrado: 1532,5; 1915,2; 2553,2
C; Encontrado: 1532,6; 1915,3; 2553,2
D; Encontrado: 1532,7; 1915,4; 2553,3

45 **[0130]** El cambio del pico y la reducción de la masa desde la parte inferior de la figura 9 a la figura 10 indican la formación de un enlace disulfuro por medio de la etapa mencionada anteriormente de plegado.

[0131] El tiempo de reacción puede cambiarse de forma adecuada (por ejemplo, 24 horas) siguiendo la reacción mediante HPLC y espectrometría de masas y confirmando un cambio en el peso molecular y un cambio en el tiempo de retención del pico mediante espectrometría de masas y HPLC, respectivamente.

50 **[0132]** Medición de RMN de la fracción B: Se disolvió una fracción B liofilizada en D₂O/H₂O al 5 % (300 μ l) y se midió 2D TOCSY a 25 °C, 60 ms y 600 MHz. El espectro de RMN resultante se muestra en la figura 11.

[0133] Medición de CD de la fracción B: Se disolvió en agua destilada una fracción B liofilizada y se llevó a cabo una medición de CD. Como instrumento, se utilizó J-820 de JASCO Corporation. La medición se llevó a cabo dentro de un rango de 180 nm a 260 nm. El espectro CD resultante se muestra en la figura 12.

55 **[0134]** A partir de la figura 11, se confirmó que el glicopéptido que tiene la misma estructura de orden superior podría purificarse en gran medida solamente mediante separación con HPLC.

2. Síntesis química del tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado no glicosilado

[0135] De manera similar a los ejemplos, se sintetizaron tres fragmentos y, a continuación, se ligaron mediante NCL para sintetizar un tercer dominio de ovomucoide de faisán plateado no glicosilado. Los fragmentos 1 y 3 se sintetizaron de manera similar a los ejemplos. Como se muestra en la figura 14, un fragmento correspondiente al fragmento 2 de los ejemplos (en adelante, denominado "fragmento 2") no tiene una cadena de azúcar como un ejemplo comparativo.

[Síntesis del fragmento 2']

[0136] En una columna de síntesis en fase sólida, se colocó 2-clorotritil resina (143 mg, 200 μ mol), que se lavó suficientemente, a continuación, con cloruro de metileno (DCM). Se preparó, por separado, DCM (1,2 mL) con Fmoc-Phe (232,4 mg, 0,6 mmol) y DIPEA (272,1 μ L, 1,6 mmol) disuelta en el mismo y se vertió en la columna de síntesis en fase sólida cargada con la resina y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, la resina se lavó con DCM: MeOH: DIPEA = 17: 2: 1, DCM y DMF. Posteriormente, se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF y se confirmó la reacción con el ensayo Kaiser. Posteriormente, se llevó a cabo la extensión de cadena peptídica mediante la condensación secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación.

[0137] Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (135,1 mg, 1 mmol) y DIPCI (153,9 μ L, 1 mmol) en DMF (0,4 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante una hora. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Asn, Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asn, Fmoc-Gly, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asn, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Ser (tBu) y Fmoc-Gly, y como último aminoácido, se utilizó Boc-Cys(Thz)-OH (233,3 mg, 1 mmol), del que se puede eliminar un grupo protector con un ácido. En la resina de fase sólida, se obtuvo un péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector de Boc-Cys (Thz) -Gly-Ser (tBu) -Asp (OtBu) -Asn-Lys (Boc) -Thr (tBu) -Tyr (tBu) -Gly-Asn-Lys (Boc) -Cys (Trt) -Asn-Phe (SEQ ID NO:11). Al péptido resultante, se le añadió AcOH: DCM: MeOH = 5: 4: 1 (2 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante tres horas. Después de remover, la resina se eliminó por filtración y se lavó con MeOH. Se concentró el filtrado a presión reducida. El filtrado concentrado se sometió a azeotrópico con una cantidad excesiva de benceno tres veces y, a continuación, el péptido resultante se liofilizó (figura 15, parte superior. Nota: la medición se realizó tras la desprotección).

[0138] En un disolvente DMF (6,8 mL), 110 mg (50 μ mol) del péptido así obtenido (el péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector, como se muestra en SEQ ID NO: 11), se removió MS4A (10 mg), mercaptano bencílico (177,4 μ L, 1,5 mmol) bajo un chorro de argón a -20 °C durante una hora. Posteriormente, se añadió PyBOP (130 mg, 250 μ mol) y DIPEA (42,5 μ L, 250 μ mol) a la mezcla resultante y, a continuación, se removió durante dos horas. Después de remover, se añadió una cantidad excesiva de éter dietílico a la solución de reacción para precipitar un compuesto, seguido de filtración. Posteriormente, el precipitado así obtenido se disolvió en DMF. La solución resultante se concentró a presión reducida, a la que se añadió una solución de TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y H₂O al 2,5 % (5 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas (figura 15, en el medio). La solución de reacción resultante se concentró a presión reducida y, a continuación, se purificó mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 9 % \rightarrow 27 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) para producir 269,6 mg de un péptido de 14 residuos con un grupo protector que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, que es Cys(Thz)-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-SBn (SEQ ID NO:12) (figura 15, parte inferior).

ESI-MS: Calculado para C₇₁H₁₀₁N₁₉O₂₂S₃: [M+2H]²⁺ 834,8. Encontrado: 834,7

[Ligación del fragmento 2' y el fragmento 3 mediante NCL]

[0139] Se colocaron dos tipos de péptidos en el mismo tubo Eppendorf, a saber 1,6 mg (0,96 μ mol) del fragmento 2' preparado como se describe anteriormente (un péptido de 14 residuos con un grupo protector que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO: 12) y 1,9 mg (0,96 μ mol) del fragmento 3 sintetizado en los ejemplos y se disolvieron en 495 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 6M). Posteriormente, se añadió tiofenol (5 μ L) a la mezcla resultante y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente (0 h en la figura 16). Después de 18 horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC (18 h en la figura 16). Posteriormente, se purificó la solución de reacción mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 \times 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) (figura 16, tras la purificación). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido de 33 residuos que tiene un grupo

protector, que es Cys(Thz)-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:13).

ESI-MS: Calculado para $C_{147}H_{227}N_{43}O_{50}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1175,9. Encontrado: 1175,4

- 5 **[0140]** El péptido de 33 residuos que tiene un grupo protector así obtenido se disolvió en una solución acuosa 0,2 M de metoxiamina (pH = 4,0). Después de cuatro horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC y se purificó el producto resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min) (figura 16, desprotección de tiazolina). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido de 33 residuos de Cys-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:14).

ESI-MS: Calculado para $C_{146}H_{227}N_{43}O_{50}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1171,9. Encontrado: 1171,5

[0141] El péptido de 33 residuos, como se muestra en SEQ ID NO:14 se obtuvo, de manera similar, también en las siguientes condiciones.

- 15 **[0142]** Se colocaron dos tipos de péptidos en tubos Eppendorf por separado, a saber 1,6 mg (0,96 μ mol) del fragmento 2' (el péptido de 14 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO: 12) y 1,9 mg (0,96 μ mol) del fragmento 3 sintetizado en los ejemplos y se disolvieron en 247,5 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 6M). A continuación, se combinó el contenido en un tubo Eppendorf. Posteriormente, se añadió tiofenol al 1 % (5 μ L) a la mezcla resultante y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente. A la reacción, le siguió HPLC y espectrometría de masas, y se confirmó la desaparición del fragmento 3 mediante HPLC tras seis horas. Después, se añadió una solución acuosa 0,2 M de metoxiamina para que el pH del sistema fuera aproximadamente 4 para desproteger el extremo N-terminal Cys. Después de seis horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante espectrometría de masas y se purificó la solución de reacción resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min).

ESI-MS: Calculado para $C_{146}H_{227}N_{43}O_{50}S_4$: $[M+3H]^{3+}$ 1171,9. Encontrado: 1171,5

[Ligación del fragmento 1 y fragmentos 2' y 3 mediante NCL]

- 30 **[0143]** Se colocaron dos tipos de péptidos en el mismo tubo Eppendorf, a saber 0,6 mg (0,17 μ mol) del péptido de 33 residuos preparado como se describe anteriormente y 1,1 mg (0,41 μ mol) del fragmento 1 sintetizado en los ejemplos (el péptido de 23 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO: 2) y se disolvieron en 485 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 8M). Posteriormente, se añadió tiofenol (15 μ L) a la mezcla resultante y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente (0 h en la figura 17). Después de 45 horas, se confirmó la terminación de la reacción mediante HPLC (45 h en la figura 17). Posteriormente, se purificó la solución de reacción mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Posteriormente, se liofilizó el péptido resultante para dar lugar a un péptido de 56 residuos de Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-Ala-Cys-Thr-Met-Glu-Tyr-Arg-Pro-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:15) (figura 17, parte inferior).

ESI-MS: Calculado para $C_{257}H_{400}N_{70}O_{84}S_7$: $[M+4H]^{4+}$ 1510,7. Encontrado: 1510,6

- 45 **[0144]** El péptido de 56 residuos, como se muestra en SEQ ID NO: 15 se obtuvo, de manera similar, también en las siguientes condiciones.

- 50 **[0145]** Se colocaron dos tipos de péptidos en tubos Eppendorf por separado, a saber, 0,6 mg (0,17 μ mol) del péptido de 33 residuos, como se muestra en SEQ ID NO: 14 y 1,1 mg (0,41 μ mol) del fragmento 1 (el péptido de 23 residuos que tiene un bencil tioéster en su extremo C-terminal, como se muestra en SEQ ID NO: 2) y se disolvieron en 247,5 μ L de un tampón fosfato 0,1% (pH 7,5, que contiene clorhidrato de guanidina 8M). A continuación, se combinó el contenido en un tubo Eppendorf. Posteriormente, se añadió tiofenol al 1 % (5 μ L) a la mezcla resultante y se dejó que tuvieran lugar las reacciones a temperatura ambiente. A la reacción, le siguió HPLC y espectrometría de masas y, después de 30 horas, se purificó la solución de reacción resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Se liofilizó el producto resultante para dar lugar al péptido de 56 residuos, como se muestra en SEQ ID NO:15. ESI-MS: Calculado para $C_{257}H_{400}N_{70}O_{84}S_7$: $[M+4H]^{4+}$ 1510,7. Encontrado: 1510,6

[Plegado de proteínas]

[0146] En un tubo Eppendorf, se transfirieron 0,4 mg (66,2 nmol) del péptido de 56 residuos (SEQ ID NO:15) preparado como se describe anteriormente que, a continuación, se disolvió en 100 µL de tampón tris 0,6 M (pH = 8,7, que contiene clorhidrato de guanidina 0,6 M y EDTA 6 mM. Se diluyó la mezcla resultante con 500 µL de agua destilada para plegar el tercer dominio de ovomucoide no glicosilado.

5 [Fraccionamiento mediante HPLC]

[0147] Después de 36 horas, se confirmó el progreso de la reacción mediante HPLC y espectrometría de masas y se purificó el producto resultante mediante HPLC (columna Cadenza CD18 (Imtakt Inc.), 3 mm, 75 × 4,6 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Como consecuencia, se obtuvieron cuatro fracciones E a H que contenían el péptido de 56 residuos que tenía una estructura de orden superior de Leu-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Cys-Ser-Glu-Tyr-Pro-Lys-Pro-A la-Cys-Thr-Met-Glu-Tyr-Arg-Pro-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Asn-Ly s-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe-Cys-Asn-Ala-Val-Val-Glu -Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-His-Phe-Gly-Lys-Cys (SEQ ID NO:15) (figura 18).

10 ESI-MS: Calculado para $C_{257}H_{394}N_{70}O_{84}S_7$: $[M+5H]^{5+}$ 1207,5; $[M+4H]^{4+}$ 1509,1; $[M+3H]^{3+}$ 2011,9;
 15 E; Encontrado: 1207,7; 1509,3; 2012,0
 F; Encontrado: 1207,6; 1509,3; 2012,0
 G; Encontrado: 1207,7; 1509,3; 2012,0
 H; Encontrado: 1207,8; 1509,3; 2012,0

[0148] El cambio del pico y la reducción de la masa desde la parte inferior de la figura 17 a la figura 18 indican la formación de un enlace disulfuro por medio de la etapa mencionada anteriormente de plegado.

20

[0149] El tiempo de reacción puede cambiarse de forma adecuada (por ejemplo, 24 horas) siguiendo la reacción mediante HPLC y espectrometría de masas y confirmando un cambio en el peso molecular y un cambio en el tiempo de retención del pico mediante espectrometría de masas y HPLC, respectivamente.

[0150] Medición de RMN de la fracción F: Se disolvió una fracción F liofilizada en D_2O/H_2O al 5 % (300 µl) y se midió 2D TOCSY a 25 °C, 80 ms y 600 MHz. El espectro de RMN resultante se muestra en la figura 19.

25

[0151] Medición de CD de la fracción F: Se disolvió en agua destilada una fracción F liofilizada y se llevó a cabo una medición de CD. Como instrumento, se utilizó J-820 de JASCO Corporation. La medición se llevó a cabo dentro de un rango de 180 nm a 260 nm. El espectro CD resultante se muestra en la figura 20.

[0152] A partir de la figura 19, se confirmó que el péptido que tiene la misma estructura de orden superior podría purificarse en gran medida solamente mediante separación con HPLC.

30

[Producción de una curva de calibración para la fracción F]

[0153] Se disolvió la fracción F (1 mg) en un tampón fosfato 0,1 M de pH 8,0 que contiene ASB (0,1 mg/ml). Se diluyó la solución resultante para preparar el fragmento F que tiene concentraciones de 165 µM, 82,5 µM, 41,3 µM y 20,6 µM. Se midió la DO 280 de una solución de cada concentración tres veces. Se promediaron los valores así obtenidos y se muestran en la tabla 1 y la figura 22.

35

[Tabla 1]

µM	1vez	2vez	3vez	media
165	0,58	0,57	0,58	0,57
82,5	0,27	0,29	0,3	0,28
41,2	0,14	0,13	0,14	0,14
20,6	0,06	0,06	0,06	0,06

<Ejemplo 2> Medición de la actividad fisiológica [Medición de la actividad fisiológica de OMSVP3 glicosilado (fracciones A a D)]

[0154] Se preparó una solución enzimática de un tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contenía quimotripsina α al 0,01 % y albúmina de suero bovino al 0,01 %) y una solución de sustrato de un tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contenía 517 µM de un péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector sintetizado en el ejemplo de referencia 1 (que se describe más adelante) (SEQ ID NO:16) y albúmina de suero bovino al 0,01 %) y se transfirieron 20 µL de cada solución a un tubo Eppendorf. Cada una de las fracciones A a D obtenidas en el ejemplo 1 se liofilizó y se disolvió por separado en tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contiene albúmina de suero bovino al 0,01 %) y se midió la DO280 de cada solución resultante para preparar soluciones de muestra de

40

45

concentración de proteínas constante. A continuación, se añadieron 20 μL de cada solución de muestra a la solución preparada como se describe anteriormente y se midió la actividad inhibitoria. En este experimento, la concentración de reacción final fue de la manera siguiente: una concentración de muestra de 2,5 μM , una concentración enzimática de 0,33 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración de sustrato de 172 μM . Las soluciones de reacción resultantes se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y, a continuación, se terminó la reacción mediante la adición de 5 μL de ácido clorhídrico 4 N. Se repitieron tres veces operaciones similares y se calculó un índice de degradación medio y una desviación típica para cada muestra. Los resultados así obtenidos se muestran en la figura 13.

[Medición de la actividad fisiológica de OMSVP3 no glicosilado (fracciones E a H)]

10 **[0155]** Se preparó una solución enzimática de un tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contenía quimotripsina α al 0,01 % y albúmina de suero bovino al 0,01 %) y una solución de sustrato de un tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contenía 517 μM de un péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector sintetizado en el ejemplo de referencia 1 (que se describe más adelante) (SEQ ID NO:16) y albúmina de suero bovino al 0,01 %) y se transfirieron 20 μL de cada solución a un tubo Eppendorf. Cada una de las fracciones E a H obtenidas en el ejemplo 1 se liofilizó y se disolvió por separado en tampón fosfato 0,1 M (pH = 8,0, que contenía albúmina de suero bovino al 0,01 %) y se midió la DO280 de cada solución resultante para preparar soluciones de muestra de concentración de proteínas constante. A continuación, se añadieron 20 μL de cada solución de muestra a la solución preparada como se describe anteriormente y se midió la actividad inhibitoria. En este experimento, la concentración de reacción final fue de la manera siguiente: una concentración de muestra de 2,5 μM , una concentración enzimática de 0,33 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración de sustrato de 172 μM . Las soluciones de reacción resultantes se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y, a continuación, se terminó la reacción mediante la adición de 5 μL de ácido clorhídrico 4 N. Se repitieron tres veces operaciones similares y se calculó un índice de degradación medio y una desviación típica para cada muestra. Los resultados así obtenidos se muestran en la figura 21.

25 <Ejemplo 3> Medición de la actividad fisiológica

(cálculo de IC_{50})

[Cálculo de IC_{50} de OMSVP3 glicosilado]

30 **[0156]** El péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector sintetizado en el ejemplo de referencia 1 (que se describe más adelante) (SEQ ID NO:16) (1,5 mg) se disolvió en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL) para preparar una solución de 1mM. La solución así obtenida se diluyó a 0,34 mM mediante la utilización de un espectrómetro de absorción (solución 1). Se disolvió quimotripsina (1 mg) en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL). La solución resultante se diluyó 10 veces y se volvió a diluir 10 veces. Se repitió la operación anterior de manera que se preparara una solución de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (solución 2). Se disolvió la fracción B en 100 μL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL), y se diluyó la solución así obtenida a 65 nM mediante la utilización de un espectrómetro de absorción. Se diluyó la solución resultante para preparar soluciones de 58,5 nM, 52 nM, 45,5 nM, 39 nM, 32,5 nM, 26 nM, 19,5 nM, 13 nM y 6,5 nM (solución 3). En el mismo tubo Eppendorf, se transfirieron 80 μL de la solución 1, que se enfrió suficientemente en hielo y 40 μL de las soluciones 2 y 3, seguido de incubación durante una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después de una hora, se terminó la reacción mediante la adición de 16 μL de ácido clorhídrico 1 N. A continuación, se mezclaron 20 μL de la solución de reacción resultante con 80 μL de tampón para formar un total de 100 μL que, a continuación, se midió mediante HPLC. Se calculó un índice de degradación por unidad de tiempo (una velocidad de reacción por unidad de tiempo) a partir del área de pico de HPLC del producto de reacción. En la figura 23, se muestran gráficos que trazan el porcentaje de inhibición con respecto a cada concentración del agente inhibidor. De manera similar, con respecto también a las fracciones A, C y D, se trazaron los gráficos de manera que las concentraciones del agente inhibidor intercalaran la concentración a la que se inhibió la actividad enzimática en un 50 %. Se muestran los gráficos resultantes (figura 23). Los valores IC_{50} de OMSVP3 glicosilado (fracciones A a D) calculados a partir de estos gráficos, se muestran en un gráfico (figura 24).

[Cálculo de IC_{50} de OMSVP3 no glicosilado]

50 **[0157]** El péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector sintetizado en el ejemplo de referencia 1 (que se describe más adelante) (SEQ ID NO:16) (1,5 mg) se disolvió en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL) para preparar una solución de 1mM. La solución así obtenida se diluyó a 0,34 mM mediante la utilización de un espectrómetro de absorción (solución 1). Se disolvió quimotripsina (1 mg) en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL). La solución resultante se diluyó 10 veces y se volvió a diluir 10 veces. Se repitió la operación anterior de manera que se preparara una solución de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (solución 2). Se disolvió la fracción F en 100 μL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL) y se diluyó la solución así obtenida a 65 nM mediante la utilización de un espectrómetro de absorción. Se diluyó la solución resultante para preparar soluciones de 58,5 nM, 52 nM, 45,5 nM, 39 nM, 32,5 nM, 26 nM, 19,5 nM, 13 nM y 6,5 nM (solución 3). En el mismo tubo Eppendorf, se transfirieron 80 μL de

solución 1, que se enfrió suficientemente en hielo y 40 µL de las soluciones 2 y 3, seguido de incubación durante una hora a 37 °C. Después de una hora, se terminó la reacción mediante la adición de 16 µL de ácido clorhídrico 1 N. A continuación, se mezclaron 20 µL de la solución de reacción resultante con 80 µL de tampón para formar un total de 100 µL que, a continuación, se midió mediante HPLC. Se calculó un índice de degradación por unidad de tiempo (una velocidad de reacción por unidad de tiempo) a partir del área de pico de HPLC del producto de reacción. En la figura 25, se muestran gráficos que trazan el porcentaje de inhibición con respecto a cada concentración del agente inhibidor. De manera similar, con respecto también a las fracciones E, G y H, se trazaron los gráficos de manera que las concentraciones del agente inhibidor intercalaran la concentración a la que se inhibió la actividad enzimática en un 50 %. Se muestran los gráficos resultantes (figura 25). Los valores IC₅₀ de OMSVP3 no glicosilado (fracciones E a F) calculados a partir de estos gráficos, se muestran en un gráfico (figura 26).

<Ejemplo 4> Medición de la estabilidad térmica

[0158] Se llenó con agua destilada una célula para la medición de CD y, a continuación, se midió a temperatura ambiente. Se proporcionó como blanco el valor de medición así obtenido y se calcularon todos los valores de medición obtenidos después mediante sustracción del valor de blanco.

[Estabilidad térmica de OMSVP3 glicosilado (fracción B)]

[0159] Se disolvió la fracción B en 300 µL de agua destilada y, a continuación, se midió a temperatura ambiente. Después de la medición, se sumergió la célula que contenía la muestra en un baño de temperatura constante para llevar a cabo un experimento de temperatura variable. En primer lugar, se sumergió la célula en un baño de temperatura constante a 50 °C durante 10 minutos y, a continuación, se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y, a continuación, se llevó a cabo una medición. Después, en una operación similar, se midió el espectro CD hasta 90 °C. Los resultados así obtenidos se muestran en la figura 27.

[Estabilidad térmica de OMSVP3 no glicosilado (fracción F)]

[0160] Se disolvió la fracción F en 300 µL de agua destilada y, a continuación, se midió a temperatura ambiente. Después de la medición, se sumergió la célula que contenía la muestra en un baño de temperatura constante para llevar a cabo un experimento de temperatura variable. En primer lugar, se sumergió la célula en un baño de temperatura constante a 50 °C durante 10 minutos y, a continuación, se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y, a continuación, se llevó a cabo una medición. Después, en una operación similar, se midió el espectro CD hasta 90 °C. Los resultados así obtenidos se muestran en la figura 28.

<Ejemplo 5> Mapeo de disulfuro del tercer dominio de ovomucoide

[0161] OMSVP3 sintetizado contiene tres enlaces disulfuro. Un enlace disulfuro se forma durante el plegado de proteínas y el proceso de formación de un enlace disulfuro es una reacción de equilibrio. Por lo tanto, se considera que un enlace disulfuro se forma, posiblemente, en una posición diferente de una proteína de origen natural.

[0162] A partir de los resultados de RMN y la evaluación de la actividad inhibitoria, se predijo que el OMSVP3 (fracción 3) sintetizado en el presente documento fuera un compuesto único y, por lo tanto, se formara un enlace disulfuro en la misma posición que una proteína de origen natural. Habida cuenta de lo anterior, se realizó el siguiente estudio para confirmar si verdaderamente se formó un enlace disulfuro en la fracción B en la misma posición que una proteína de origen natural.

[Mapeo de disulfuro de OMSVP3 que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes (fracción B)]

[0163] Se sometió a reacción bromuro de cianógeno (1 mg/mL) con la fracción B obtenida en el ejemplo 1 (0,4 mg) en una solución acuosa de acetonitrilo al 40 % y TFA al 2 % a 37 °C durante la noche en condiciones protegidas de la luz. Se liofilizó y purificó el producto resultante mediante HPLC (columna C4 VyDAC (Imtakt Inc.), 3 µm, 4,5 × 250 mm, disolvente de desarrollo A; una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 → 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % → 54 %) 30 minutos un caudal de 1,0 mL/min) para dar lugar a la fracción I. ESI-MS: Calculado para C₃₁₈H₄₉₄N₇₄O₁₃₀S₆: [M+4H]⁴⁺, 1907,5; Encontrado: 1907,4

[0164] A continuación, se disolvió la fracción I (0,1 mg) en un tampón tris 50 mM (pH 7,6, que contenía 10 mM de CaCl₂) con termolisina (50 µg/mL) disuelta en el mismo y, a continuación, se incubó a 37 °C. Después de tres horas, se purificó la mezcla resultante mediante HPLC (columna C4 VyDAC (Imtakt Inc.), 3 µm, 4,5 × 250 mm, disolvente de desarrollo A; una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 95: 5 → 50: 50 (gradiente de acetonitrilo: 4,5 % → 45 %) 15 minutos un caudal de 1,0 ml/min) para dar lugar a las fracciones II a VI (figuras 29 y 30).

Fracción II; Calculado para C₃₅H₅₄N₁₀O₁₃S₂: [M+2H]²⁺, 444,8; Encontrado 444,7

Fracción III; Calculado para $C_{25}H_{37}N_7O_8$: $[M+H]^+$, 564,4, Encontrado 564,4 Fracción IV; Calculado para $C_{114}H_{187}N_{19}O_{64}S_2$: $[M+3H]^{3+}$, 971,6; Encontrado 971,5
Fracción V; Calculado para $C_{123}H_{196}N_{20}O_{66}S_2$: $[M+3H]^{3+}$, 1026,0; Encontrado 1025,9
Fracción VI; Calculado para $C_{64}H_{93}N_{15}O_{22}S_2$: $[M+2H]^{2+}$, 744,8; Encontrado 745,0

5 [Mapeo de disulfuro de OMSVP3 no glicosilado (fracción F)]

[0165] Se sometió a reacción bromuro de cianógeno (1 mg/mL) con la fracción F obtenida en el ejemplo 1 (0,4 mg) en una solución acuosa de acetonitrilo al 40 % y TFA al 2 % a 37 °C durante la noche en condiciones protegidas de la luz. Se liofilizó y purificó el producto resultante mediante HPLC (columna C4 VyDAC (Imtakt Inc.), 3 μ m, 4,5 \times 250 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 80: 20 \rightarrow 40: 60 (gradiente de acetonitrilo: 18 % \rightarrow 54 %) 30 minutos un caudal de 1,0 mL/min) para dar lugar a la fracción VII. ESI-MS: Calculado para $C_{256}H_{392}N_{70}O_{85}S_6$: $[M+4H]^{4+}$, 1501,6; Encontrado: 1501,5

[0166] A continuación, se disolvió la fracción VII (0,1 mg) en un tampón tris 50 mM (pH 7,6, que contenía 10 mM de $CaCl_2$) con termolisina (50 μ g/mL) disuelta en el mismo y, a continuación, se incubó a 37 °C. Después de cuatro horas, se purificó la mezcla resultante mediante HPLC (columna C4 VyDAC (Imtakt Inc.), 3 μ m, 4,5 \times 250 mm, disolvente de desarrollo A; una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 95: 5 \rightarrow 50: 50 (gradiente de acetonitrilo: 4,5 % \rightarrow 45 %) 15 minutos un caudal de 1,0 ml/min) para dar lugar a las fracciones VIII a XI (figuras 31 y 32).

ESI-MS:

- 20 Fracción VIII; Calculado para $C_{35}H_{54}N_{10}O_{13}S_2$: $[M+2H]^{2+}$, 444,8; Encontrado 444,7
Fracción IX; Calculado para $C_{25}H_{37}N_7O_8$: $[M+H]^+$, 564,4; Encontrado 564,4
Fracción X; Calculado para $C_{52}H_{85}N_{15}O_{19}S_2$: $[M+2H]^{2+}$, 644,8; Encontrado 644,9
Fracción XI; Calculado para $C_{64}H_{93}N_{15}O_{22}S_2$: $[M+2H]^{2+}$, 744,8; Encontrado 744,9

[0167] La cadena peptídica se escindió, de forma específica, en una posición de metionina en la secuencia de OMSVP3 glicosilado (fracción B) mediante tratamiento con CNBr (fracción I) y, posteriormente, se digirió con termolisina. En consecuencia, se obtuvieron fragmentos peptídicos unidos mediante un enlace disulfuro (figura 29). Cada fragmento peptídico se purificó y se midió para la masa mediante masa ESI. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis para averiguar a qué fragmento de OMSVP3 correspondía la masa así obtenida. En la parte inferior de la figura 33, se muestra la estructura propuesta obtenida de esta manera. Mediante la utilización del método similar, se analizó el OMSVP3 no glicosilado (fragmento F) de manera similar (véanse las figuras 31 y 34) y la estructura propuesta obtenida de esta manera se muestra en la parte inferior de la figura 34. Se confirmó que el enlace disulfuro se formó en la misma posición que el OMSVP3 de origen natural (figuras 31 y 34). La posición del enlace disulfuro en las fracciones B y F propuesta por el mapeo de disulfuro correspondía a la posición del enlace disulfuro en el OMSVP3 de origen natural, que ya se había analizado.

[0168] A partir de los resultados anteriores, se propuso que una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior podría producirse mediante las etapas de plegado, fraccionamiento y recogida de la presente invención. Además, en el caso de OMSVP3, la fracción obtenida como pico máximo en la etapa de fraccionamiento de la presente invención tenía el mismo enlace disulfuro que el OMSVP3 de origen natural. Además, la fracción era muy activa y podría producirse una glicoproteína que tiene una estructura y actividad deseadas de forma eficiente mediante esta fracción. El descubrimiento mencionado anteriormente también indica que, con respecto al caso en que se produzca otra glicoproteína, incluso cuando la fracción de pico máximo no tiene ni actividad deseada ni estructura deseada, todavía puede producirse una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior mediante la recogida adecuada de otras fracciones que tienen una actividad deseada, y esto no impide la viabilidad de la presente invención de ninguna manera.

[0169] En ejemplos de la presente invención, el patrón obtenido mediante el fraccionamiento del tercer dominio de ovomucoide plegado que tiene una glicoproteína mediante HPLC (figura 10) y el patrón obtenido mediante el fraccionamiento del tercer dominio no glicosilado plegado mediante HPLC (figura 18) tenían ambos cuatro semanas y eran relativamente similares. Asimismo, teniendo en cuenta que también presentaban ambos intensidad de actividad similar, es decir, se observó que la intensidad era fracción A > fracción B > fracción D > fracción C y fracción F > fracción E > fracción H > fracción G (figuras 13 y 21) en el ejemplo 2, y fracción A > fracción B > fracción C > fracción D y fracción E > fracción F > fracción G > fracción H (figuras 23 a 26) en el ejemplo 3, parecía que una proteína que tenía estructura de orden superior uniforme se eluyó en el mismo orden. El descubrimiento de que la posición del enlace disulfuro en las fracciones B y F, las cuales presentaban una actividad elevada y se obtuvieron como pico máximo entre otras fracciones, era la misma también era coherente con los resultados mencionados anteriormente.

[0170] Sin embargo, los espectros CD de las fracciones B y F no coincidían, lo que sugiere que estas fracciones tienen estructuras de orden superior diferentes (figuras 12 y 20). Esto sugiere que la adición de una cadena de

azúcar puede, posiblemente, cambiar la estructura de orden superior de una proteína, deformando el plegado de una proteína no glicosilada y similares.

5 **[0171]** Se prevé que dicha alteración en la estructura de orden superior de una proteína podría afectar a la actividad fisiológica teniendo en cuenta que también afecta a la capacidad de unión de la proteína a un sustrato y similares y, además, también podría afectar a la vida media sanguínea teniendo en cuenta que también afecta a la permeabilidad de la filtración glomerular y similares. Según lo anterior, se desprende que, cuando se utiliza una glicoproteína como producto farmacéutico, es importante solamente purificar y separar una proteína que tiene una estructura de orden superior constante en el estado en que está glicosilado para producir una medicina que ejerza una actividad fisiológica y vida media sanguínea constantes. En este sentido, la presente invención
10 permite lo anterior.

<Ejemplo de referencia 1 Síntesis de un sustrato para el ensayo de actividad inhibitoria>

[Síntesis de un péptido sustrato]

15 **[0172]** En una columna de síntesis en fase sólida, se colocó 2-clorotritil resina (143 mg, 200 µmol), que se lavó suficientemente, a continuación, con cloruro de metileno (DCM). Se preparó, por separado, DCM (1,2 mL) con Fmoc-Phe (232,4 mg, 0,6 mmol) y DIPEA (272,1 µL, 1,6 mmol) disuelta en el mismo y se vertió en la columna de síntesis en fase sólida cargada con la resina y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, la resina se lavó con DCM: MeOH: DIPEA = 17: 2: 1, DCM y DMF. Posteriormente, se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) durante 20 minutos. El producto resultante se lavó con DMF y se confirmó la reacción con el ensayo Kaiser.
20 Posteriormente, se llevó a cabo la extensión de cadena peptídica mediante la condensación secuencial de aminoácidos por medio de la utilización del método que se muestra a continuación.

25 **[0173]** Se disolvió un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo Fmoc y HOBt (135,1 mg, 1 mmol) y DIPCI (153,9 µL, 1 mmol) en DMF (0,4 mL) y la solución resultante se activó durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la solución en la columna de síntesis en fase sólida y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante una hora. Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF. Se desprotegió el grupo Fmoc mediante tratamiento con una solución de piperidina/DMF al 20 % (1 mL) durante 20 minutos. Se repitió la operación anterior para condensar aminoácidos de manera secuencial. Como aminoácido que tiene un grupo amino protegido, se utilizó Fmoc-Asn, Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asn, Fmoc-Gly, Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asn, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Ser (tBu) y Fmoc-Gly, y como último aminoácido, se utilizó Boc-Cys(Thz)-OH (233,3 mg, 1 mmol). En la resina de fase sólida, se obtuvo un péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector de Boc-Cys (Thz) -Gly-Ser (tBu) -Asp (OtBu) -Asn-Lys (Boc) -Thr (tBu) -Tyr (tBu) -Gly-Asn-Lys (Boc) -Cys (Trt) -Asn-Phe (SEQ ID NO.11). Al péptido resultante, se le añadió una solución que contiene TFA al 95 %, TIPS al 2,5 % y H₂O al 2,5 % (3 mL) y, a continuación, se removió a temperatura ambiente durante dos horas. Después de remover, se eliminó la resina por filtración y se concentró el filtrado a presión reducida. Se purificó el filtrado concentrado mediante HPLC (columna C4 VyDAC (Imtakt Inc.), 3 µm, 4,5 × 250 mm, disolvente de desarrollo A: una solución acuosa de TFA B al 0,09 %: acetonitrilo TFA al 0,1 %: agua = 90: Gradiente 10 A: B = 95: 5 20 → 50: 50 (gradiente de acetonitrilo: 4,5% → 45%) 15 minutos un caudal de 1,0 mL/min). Se liofilizó el producto resultante para dar lugar a un péptido de 14 residuos que tiene un grupo protector de Cys(Thz)-Gly-Ser-Asp-Asn-Lys-Thr-Tyr-Gly-Asn-Lys-Cys-Asn-Phe (SEQ ID NO:16).
30 ESI-MS: Calculado para C₆₄H₉₅N₁₉O₂₃S₂: [M+2H]²⁺, 782,34; Encontrado: 782,2
35

[Producción de una curva de calibración para un péptido sustrato]

45 **[0174]** En 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB (0,1 mg/ml)), se disolvió 1,5 mg del péptido de 14 residuos sintetizado de esta manera. Se diluyó la mezcla resultante para preparar soluciones que tienen concentraciones de sustrato de 0,6 mM, 0,4 mM, 0,2 mM y 0,1 mM. Se midió la DO 280 de una solución de cada concentración. Se promediaron los valores así obtenidos y se muestran en la tabla 2 y la figura 35.

[Tabla 2]

mM	1vez	2vez	3vez	media
0,6	0,85	0,85	0,83	0,84
0,4	0,6	0,58	0,56	0,58
0,2	0,3	0,28	0,28	0,28
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

[Adquisición del gráfico de Michaelis-Menten del péptido sustrato]

[0175] En 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB (0,1 mg/mL)), se disolvieron 3,1 mg del péptido de 14 residuos sintetizado de esta manera (SEQ ID NO:16) para preparar una solución de 2 mM. Se diluyó esta solución para preparar soluciones de sustrato con concentraciones de 1,6 mM, 1,2 mM, 0,8 mM, 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM y 0,05 mM. Por separado, se disolvió quimotripsina (1 mg) en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL). La solución resultante se diluyó 10 veces y se volvió a diluir 10 veces. Se repitió la operación anterior de manera que se preparara una solución de 0,1 µg/mL. En el mismo tubo Eppendorf, se transfirieron 50 µL de una solución de sustrato de cada concentración, que se enfrió suficientemente en hielo y 50 µL de la solución enzimática, seguido de incubación durante 30 minutos a 37 °C. Después de 30 minutos, se terminó la reacción mediante la adición de 10 µL de ácido clorhídrico 1 N. A continuación, se mezclaron 20 µL de la solución de reacción resultante con 80 µL de tampón para formar un total de 100 µL que, a continuación, se midió mediante HPLC. Se calculó un índice de degradación por unidad de tiempo (una velocidad de reacción por unidad de tiempo) a partir del área de pico de HPLC del producto de reacción (figura 36). La velocidad de reacción con respecto a cada concentración de sustrato se muestra en la tabla 3.

15

[Tabla 3]

sustrato(mM)	V (mol/min)
1	0,087
0,8	0,083
0,6	0,075
0,4	0,068
0,2	0,046
0,1	0,027
0,05	0,013

[Adquisición del gráfico de Lineweaver-Burk del péptido sustrato]

[0176] En 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB (0,1 mg/mL)), se disolvieron 1,5 mg del péptido de 14 residuos sintetizado de esta manera (SEQ ID NO:16) para preparar una solución de 1 mM. Se diluyó esta solución para preparar soluciones de sustrato con concentraciones de 1 mM, 500 µM, 333 µM, 250 µM y 200 µM. Por separado, se disolvió quimotripsina (1 mg) en 1 mL de un tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0, que contenía ASB 0,1 mg/mL). La solución resultante se diluyó 10 veces y se volvió a diluir 10 veces. Se repitió la operación anterior de manera que se preparara una solución de 0,1 µg/mL. En el mismo tubo Eppendorf, se transfirieron 50 µL de una solución de sustrato de cada concentración, que se enfrió suficientemente en hielo y 50 µL de la solución enzimática, seguido de incubación durante 30 minutos a 37 °C. Después de 30 minutos, se terminó la reacción mediante la adición de 10 µL de ácido clorhídrico 1 N. A continuación, se mezclaron 20 µL de la solución de reacción resultante con 80 µL de tampón para formar un total de 100 µL que, a continuación, se midió mediante HPLC. Se calculó un índice de degradación por unidad de tiempo (una velocidad de reacción por unidad de tiempo) a partir del área de pico de HPLC del producto de reacción (figura 37). En la tabla 4, se muestra un inverso de la velocidad de reacción con respecto a un inverso de cada concentración de sustrato.

30

[Tabla 4]

1/Sustrato(1/mM)	1/V(1/mol/min)
2	7,02
4	8,51
6	11,9
8	10,9
10	14,7

[Aplicabilidad industrial]

[0177] El método de producción de la presente invención permitió la adquisición de una glicoproteína que tiene una estructura uniforme de secuencia de aminoácidos y de cadena de azúcar, así como una estructura de orden superior uniforme. Puesto que la glicoproteína obtenida mediante el método de producción de la presente invención tiene una estructura de orden superior uniforme, no solamente son constantes su vida media sanguínea y traslado intracelular, sino que también tiene una actividad fisiológica uniforme. Además, de acuerdo con la presente invención, puede controlarse una mezcla de glicoproteínas para tener una actividad fisiológica deseada. En consecuencia, el método de producción de la presente invención se puede aplicar específicamente al desarrollo de un producto farmacéutico que utilice una glicoproteína.

[Texto libre de lista de secuencias]

10 **[0178]**

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector del fragmento 1.
 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo bencil tioéster del fragmento 1.
 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector del fragmento 2.
 SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene un grupo protector del fragmento 2.
 15 SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene un grupo bencil tioéster y un grupo protector del fragmento 2.
 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector del fragmento 3.
 SEQ ID NO:7 es el aminoácido del fragmento 3.
 SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene un grupo protector.
 20 SEQ ID NO:9 es una secuencia de aminoácidos glicosilada.
 SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos glicosilada de OMSVP3 glicosilado.
 SEQ ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector del fragmento 2'.
 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo bencil tioéster y un grupo protector del fragmento 2'.
 25 SEQ ID NO:13 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector.
 SEQ ID NO:14 es una secuencia de aminoácidos.
 SEQ ID NO:15 es la secuencia de aminoácidos de OMSVP3 no glicosilado.
 SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos que tiene un grupo protector, que es un sustrato de quimotripsina.

30 [Lista de secuencias]

LISTA DE SECUENCIAS

[0179]

<110> Otsuka Chemical Co., Ltd.
 <120> Método de elaboración de glicoproteína y método de selección de glicoproteína
 35 <130> OCKP0803P1F
 <150> JP 2008-211144
 < 151> 2008-08-19
 <150> JP 2009-029206
 < 151> 2009-06-08
 40 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 23
 <212> PRT
 45 <213> faisán plateado
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupos de bloqueo (fragmento 1)
 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (1) .. (1)
 <223> Leu que tiene grupo de bloqueo Boc

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu
5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> Asp que tiene grupo de bloqueo OtBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9) .. (9)
<223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10) .. (10)
20 <223> Glu que tiene grupo de bloqueo OtBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11) .. (11)
<223> Tyr que tiene grupo de bloqueo tBu

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (13) .. (13)
<223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16) .. (16)
30 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
35 <223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19) .. (19)
40 < 223> Glu que tiene grupo de bloqueo OtBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20) .. (20)
<223> Tyr que tiene grupo de bloqueo tBu

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (21) .. (21)
<223> Arg que tiene grupo de bloqueo Pbf
<400> 1

      Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Cys Ser Glu Tyr Pro Lys Pro Ala
      Cys
      1           5           10           15

      Thr Met Glu Tyr Arg Pro Leu
50           20

```

ES 2 646 119 T3

<210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> faisán plateado
 5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupo bencil tioéster
 (fragmento 1)
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (23) .. (23)
 <223> Leu que tiene grupo bencil tioéster
 <400> 2
 Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Cys Ser Glu Tyr Pro Lys Pro Ala
 Cys
 1 5 10 15
 Thr Met Glu Tyr Arg Pro Leu
 20
 <210> 3
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> faisán plateado
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupos de bloqueo (fragmento
 20 2)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Lys que tiene grupos de bloqueo Fmoc y Boc
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Tyr que tiene grupo de bloqueo tBu
 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (6) .. (6)
 <223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 40 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt
 <400> 3
 Lys Thr Tyr Gly Asn Lys Cys Asn Phe
 1 5
 <210> 4
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> faisán plateado
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene grupos

de bloqueo
(fragmento 2)

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> Cys que tiene grupos de bloqueo Boc y Thz

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> Asp que tiene grupo de bloqueo OtBu

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Asn glicosilado

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6) .. (6)
<223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Tyr que tiene grupo de bloqueo tBu

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

50 <400> 4

	Cys	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe
	1				5					10				

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> faisán plateado

45 <220>
<223> secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene grupo bencil tioéster y grupo de bloqueo (fragmento 2)

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> Cys que tiene grupo de bloqueo Thz

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Asn glicosilada

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> Phe que tiene grupo bencil tioéster
 <400> 5

10

	Cys	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe
	1				5					10				

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> faisán plateado

15

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupos de bloqueo (fragmento 3)

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Glu que tiene grupo de bloqueo OtBu

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15) .. (15)
 <223> His que tiene grupo de bloqueo Trt

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18) .. (18)
 <223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19) .. (19)
 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

ES 2 646 119 T3

```

<400> 6
      Cys Asn Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His
      Phe
      1           5           10           15
      Gly Lys Cys

<210> 7
<211> 19
5 <212> PRT
  <213> faisán plateado

<220>
<223> secuencia de aminoácidos (fragmento 3)

<400> 7
      Cys Asn Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His
      Phe
      1           5           10           15
10      Gly Lys Cys

<210> 8
<211> 33
  <212> PRT
  <213> faisán plateado

15 <220>
  <223> secuencia de aminoácidos glicosilada que tiene grupos de bloqueo

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
20 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Thz

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
  <223> Asn glicosilada

25 <400> 8
      Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr Gly Asn Lys Cys Asn Phe Cys
      Asn
      1           5           10           15
      Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His Phe Gly
      Lys
           20           25           30
      Cys

<210> 9
<211> 33
30 <212> PRT
  <213> faisán plateado

<220>
<223> secuencia de aminoácidos glicosilada

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
35 <223> Asn glicosilado

<400> 9

```

ES 2 646 119 T3

```

Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr Gly Asn Lys Cys Asn Phe Cys
Asn
1           5           10           15

Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His Phe Gly
Lys
           20           25           30

Cys

```

5 <210> 10
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> faisán plateado

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos glicosilada (OMSVP3 glicosilado)

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28) .. (28)
 <223> Asn glicosilado

<400> 10

```

Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Cys Ser Glu Tyr Pro Lys Pro Ala
Cys
1           5           10           15

Thr Met Glu Tyr Arg Pro Leu Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr
Gly
           20           25           30

Asn Lys Cys Asn Phe Cys Asn Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr
Leu
  @ @ @ @35           40           45

Thr Leu Ser His Phe Gly Lys Cys
  50           55

```

15 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> faisán plateado

20 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupos de bloqueo (fragmento 2 f)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Cys que tiene grupos de bloqueo Boc y Thz

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ser que tiene grupo de bloqueo tBu

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Asp que tiene grupo de bloqueo OtBu

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

ES 2 646 119 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Thr que tiene grupo de bloqueo tBu

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Tyr que tiene grupo de bloqueo tBu

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Lys que tiene grupo de bloqueo Boc

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Trt

<400> 11

Cys	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe
1				5					10				

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> faisán plateado

20

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupo bencil tioéster y grupo de bloqueo (fragmento 2 f)

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Thz

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> Phe que tiene grupo bencil tioéster

35

<400> 12

Cys	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe
1				5					10				

<210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> faisán plateado

40

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupo de bloqueo

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Cys que tiene grupo de bloqueo Thz

45

<400> 13

ES 2 646 119 T3

Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr Gly Asn Lys Cys Asn Phe Cys
 Asn
 1 5 10 15
 Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His Phe Gly
 Lys
 20 25 30
 Cys

5 <210> 14
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> faisán plateado
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos
 <400> 14

Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr Gly Asn Lys Cys Asn Phe Cys
 Asn
 1 5 10 15
 Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser His Phe Gly
 Lys
 20 25 30
 Cys

10 <210> 15
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> faisán plateado
 15 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos (OMSVP3 no glicosilado)
 <400> 15

Leu Ala Ala Val Ser Val Asp Cys Ser Glu Tyr Pro Lys Pro Ala
 Cys
 1 5 10 15
 Thr Met Glu Tyr Arg Pro Leu Cys Gly Ser Asp Asn Lys Thr Tyr
 Gly
 20 25 30
 Asn Lys Cys Asn Phe Cys Asn Ala Val Val Glu Ser Asn Gly Thr
 Leu
 @ @ @ @35 40 45
 Thr Leu Ser His Phe Gly Lys Cys
 50 55

20 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de aminoácidos que tiene grupo de bloqueo
 (sustrato para quimotripsina)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)

ES 2 646 119 T3

<223> Cys que tiene grupo de bloqueo Thz

<400> 16

Cys	Gly	Ser	Asp	Asn	Lys	Thr	Tyr	Gly	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe
1				5					10				

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una glicoproteína que tiene estructura uniforme de secuencia de aminoácidos, de cadena de azúcar y estructura de orden superior, que comprende las siguientes etapas (a) a (c):
- 5 (a) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes para generar glicoproteínas plegadas que tienen diversos tipos de estructuras de orden superior;
- (b) fraccionar las glicoproteínas plegadas por medio de cromatografía en columna para obtener diversas fracciones que contienen dichas glicoproteínas plegadas; y
- (c) recoger una fracción que tiene una actividad predeterminada de las fracciones obtenidas mediante la etapa (b).
- 10 2. Método según la Reivindicación 1, que comprende además, después de la etapa (c), las etapas de:
- (d) desplegar una glicoproteína contenida en una fracción no recogida en la etapa (c);
- (e) volver a plegar la glicoproteína desplegada;
- (f) fraccionar la glicoproteína que se ha vuelto a plegar mediante cromatografía en columna y recoger una fracción que tiene una actividad predeterminada; y
- 15 (g) repetir las etapas (d) a (f) según sea necesario.
3. Método para la selección de una glicoproteína que tiene una actividad fisiológica predeterminada, que comprende las siguientes etapas (i) a (iii):
- (i) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes para generar glicoproteínas plegadas que tienen diversos tipos de estructuras de orden superior;
- 20 (ii) fraccionar las glicoproteínas plegadas por medio de cromatografía en columna para obtener diversas fracciones que contienen dichas glicoproteínas plegadas; y
- (iii) medir una actividad de cada una de las fracciones obtenidas mediante la etapa (ii) para determinar si tiene o no una actividad predeterminada.
4. Método para obtener una mezcla de glicoproteínas con una actividad fisiológica deseada, que comprende las siguientes etapas (A) a (D):
- 25 (A) plegar una glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes para generar glicoproteínas plegadas que tienen diversos tipos de estructuras de orden superior;
- (B) fraccionar las glicoproteínas plegadas por medio de cromatografía en columna para obtener diversas fracciones que contienen dichas glicoproteínas plegadas;
- 30 (C) medir una actividad de cada una de las fracciones obtenidas mediante la etapa (B); y
- (D) determinar una proporción de mezcla de las fracciones para obtener una actividad deseada y mezclar las fracciones de acuerdo con la proporción así obtenida.
5. Método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, donde al menos una parte de la glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes se produce mediante un método que comprende las siguientes etapas (1) a (6):
- 35 (1) esterificar un grupo hidroxilo de una resina que tiene un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble;
- 40 (2) eliminar el grupo protector liposoluble para generar un grupo amino libre;
- (3) amidar el grupo amino libre y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble o un grupo carboxilo de un aminoácido glicosilado que tiene un grupo amino protegido con un grupo protector liposoluble;
- 45 (4) después de la etapa (3), eliminar el grupo protector liposoluble para generar un grupo amino libre;
- (5) repetir las etapas (3) y (4) una o más veces; y
- (6) escindir un enlace éster formado en la etapa (1) por un ácido.
6. Método según la Reivindicación 5, donde una parte de la glicoproteína que tiene secuencia de aminoácidos y cadena de azúcar uniformes se produce mediante las etapas (1) a (6), y donde la glicoproteína se produce por medio de un método que comprende además la siguiente etapa (7):
- 50 (7) unir una parte de la glicoproteína obtenida en la etapa (6) con otros péptidos o glicopéptidos mediante un método de ligación.

Figura 1

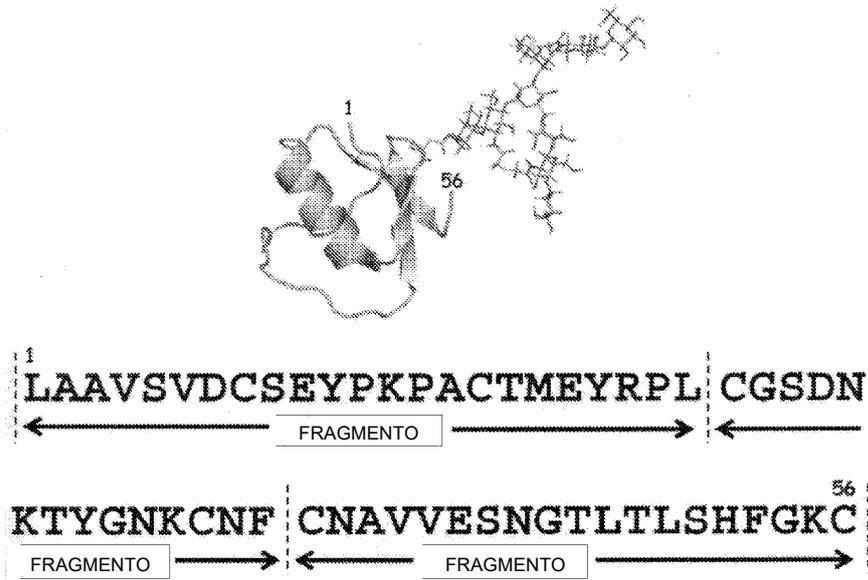


Figura 2

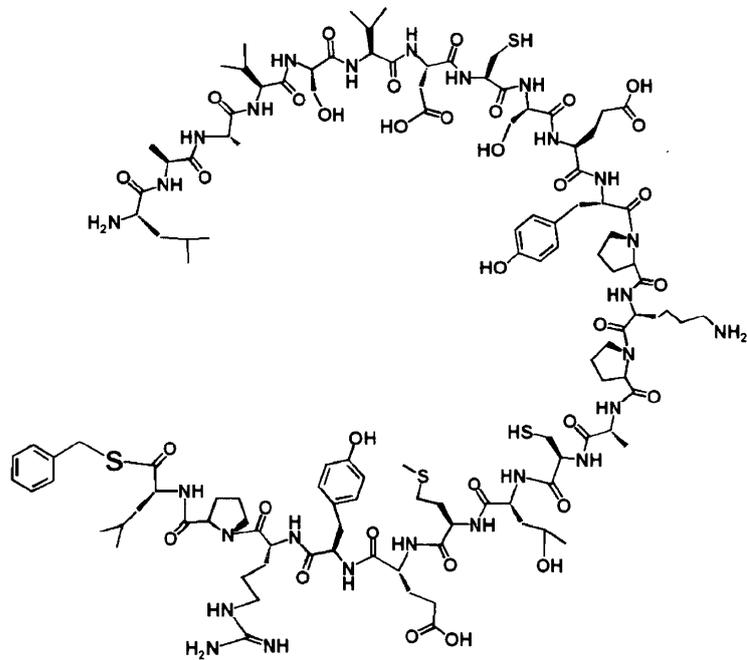


Figura 5

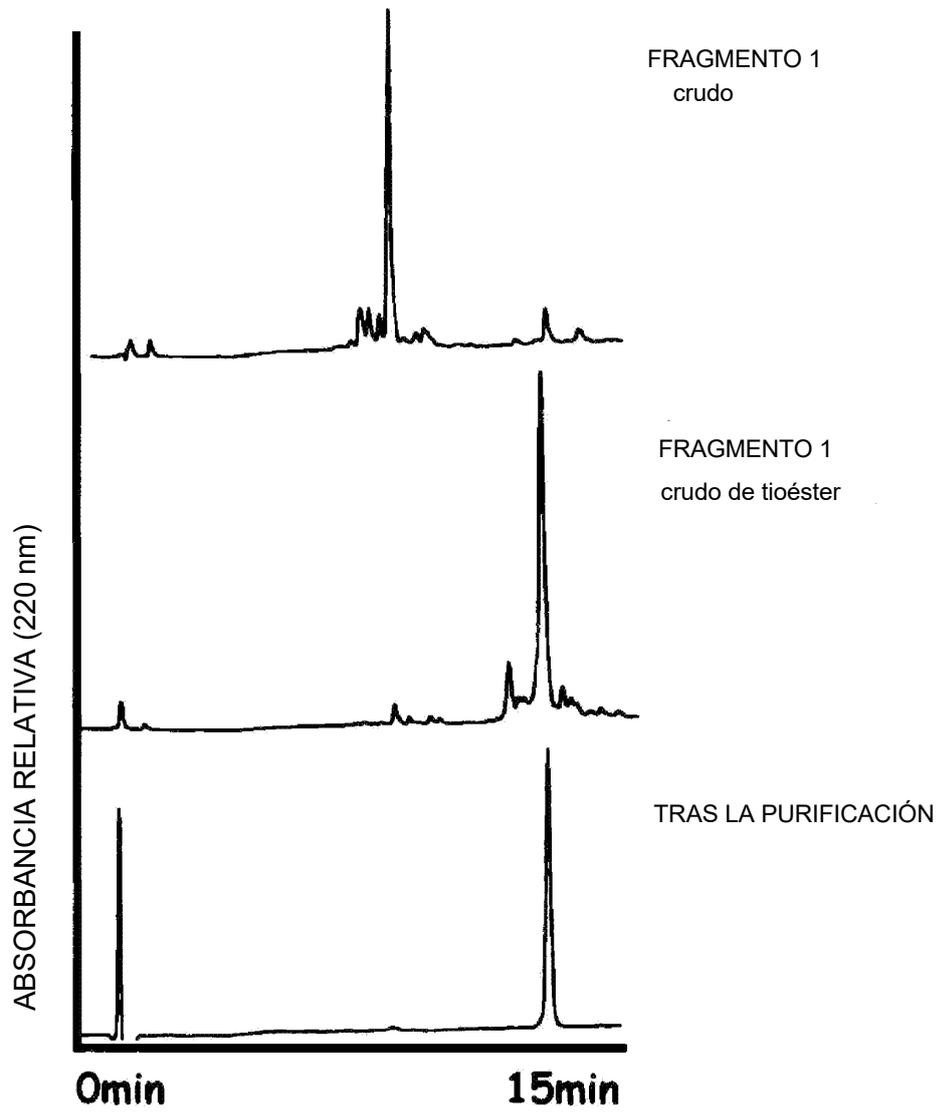


Figura 6

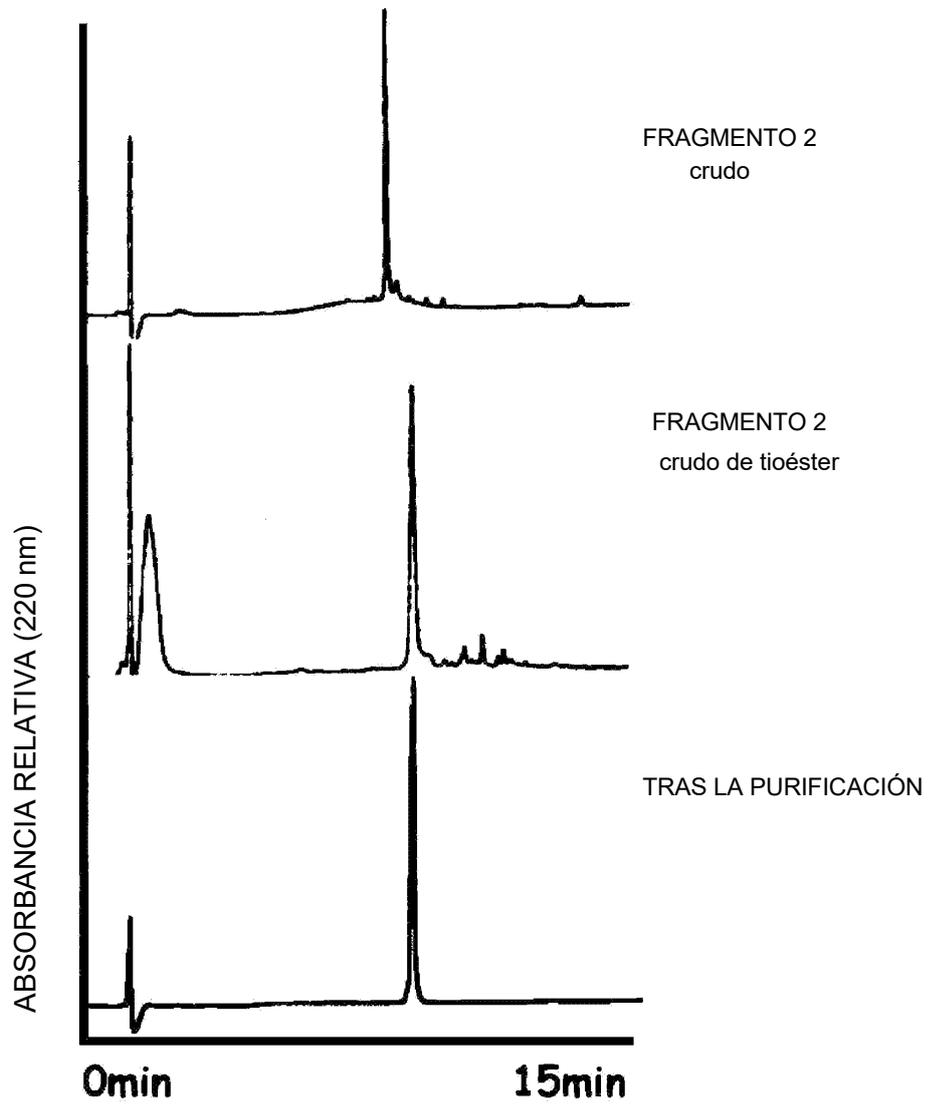


Figura 7

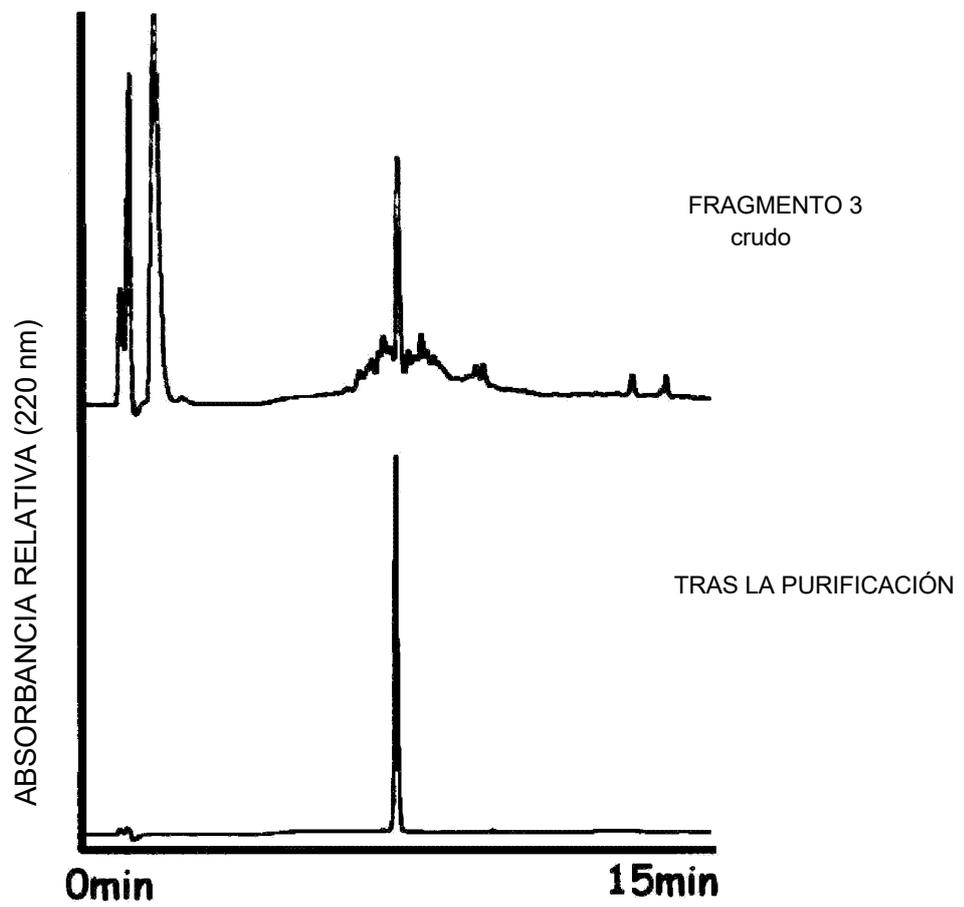


Figura 8

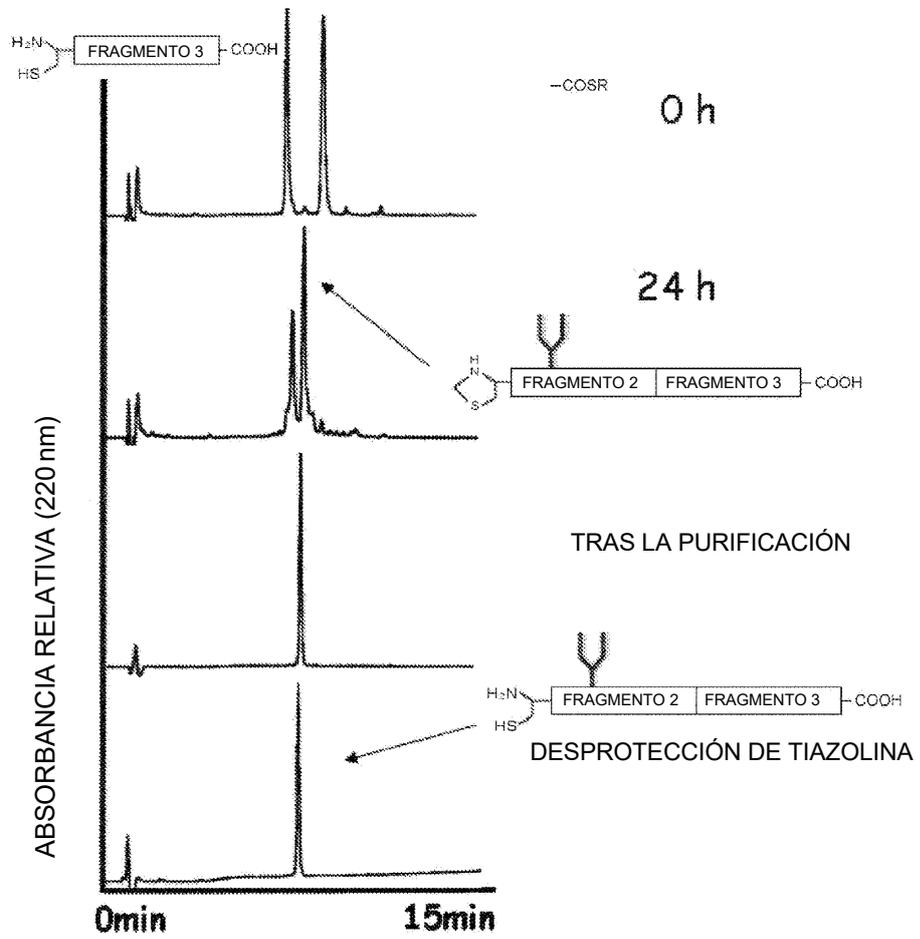


Figura 9

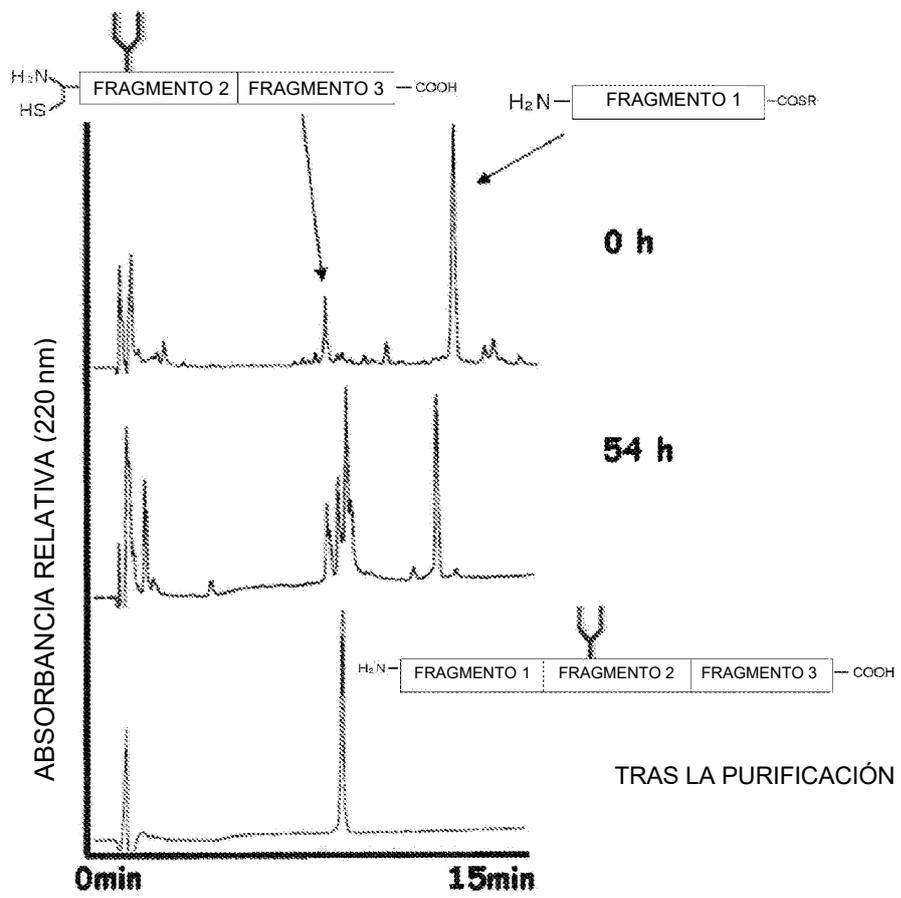


Figura 10

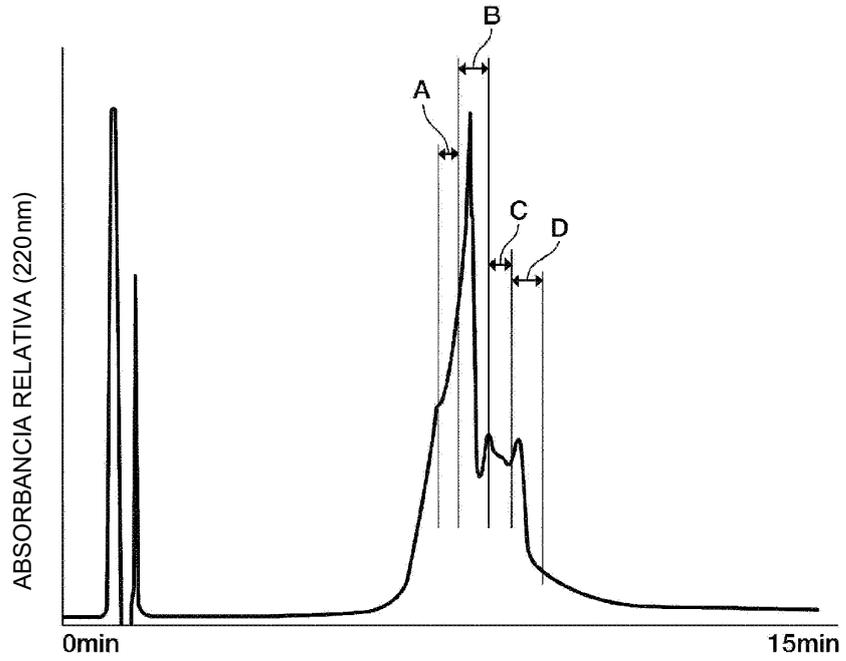


Figura 11

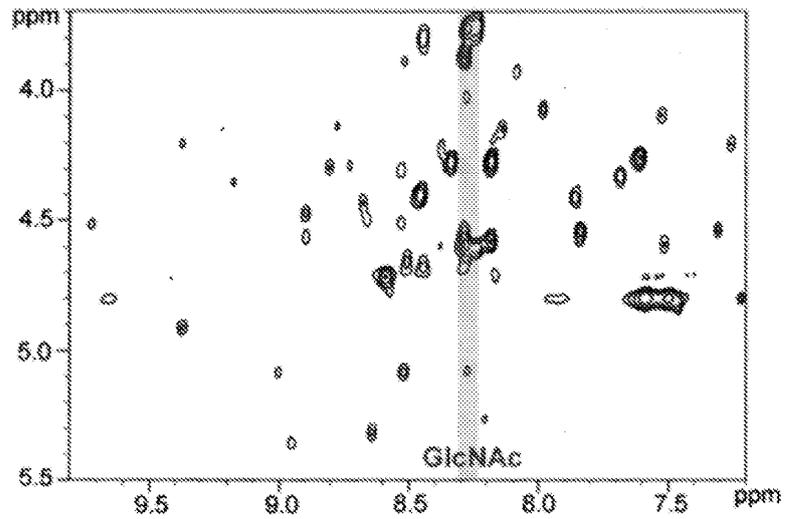


Figura 12

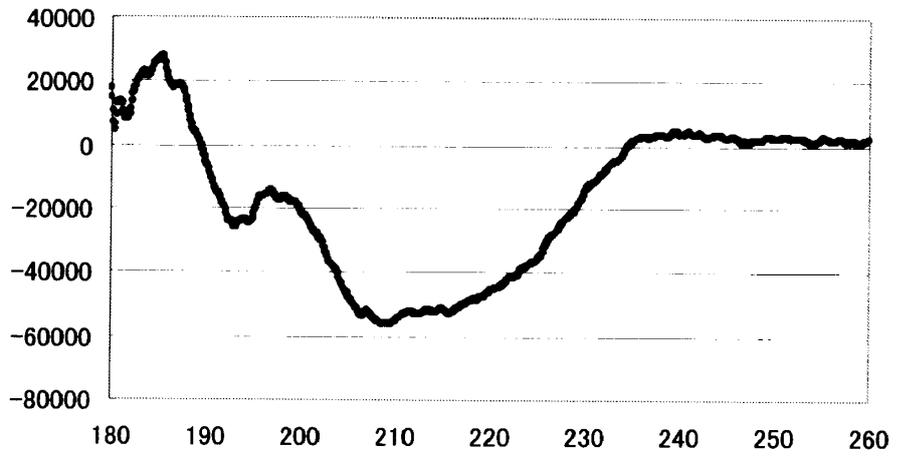


Figura 13

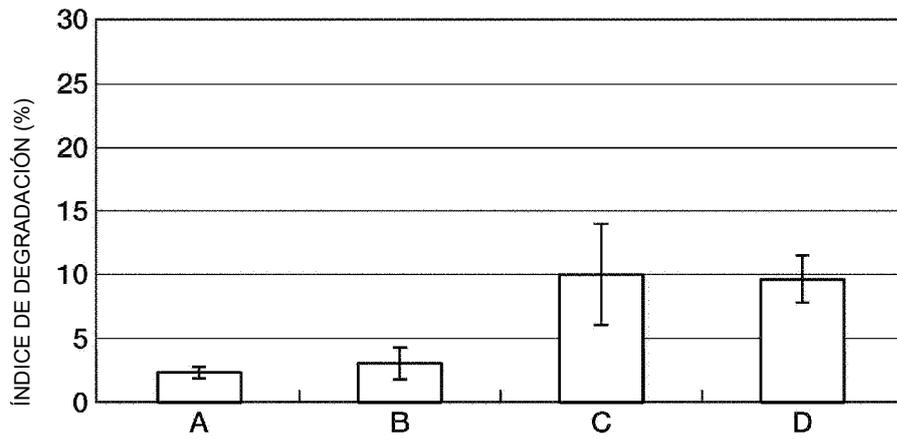


Figura 14

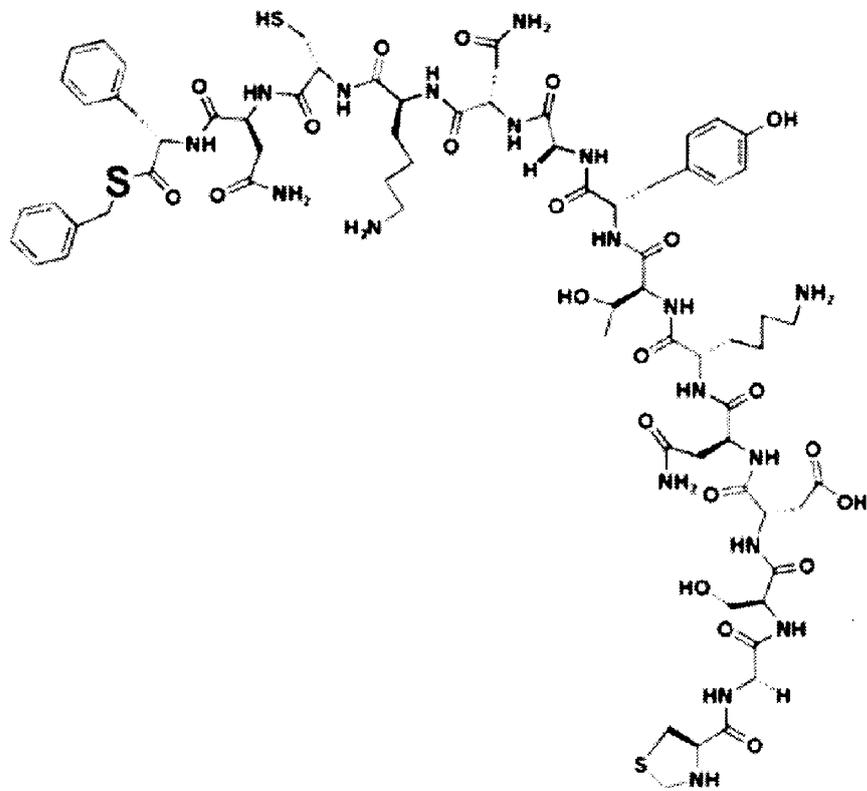


Figura 15

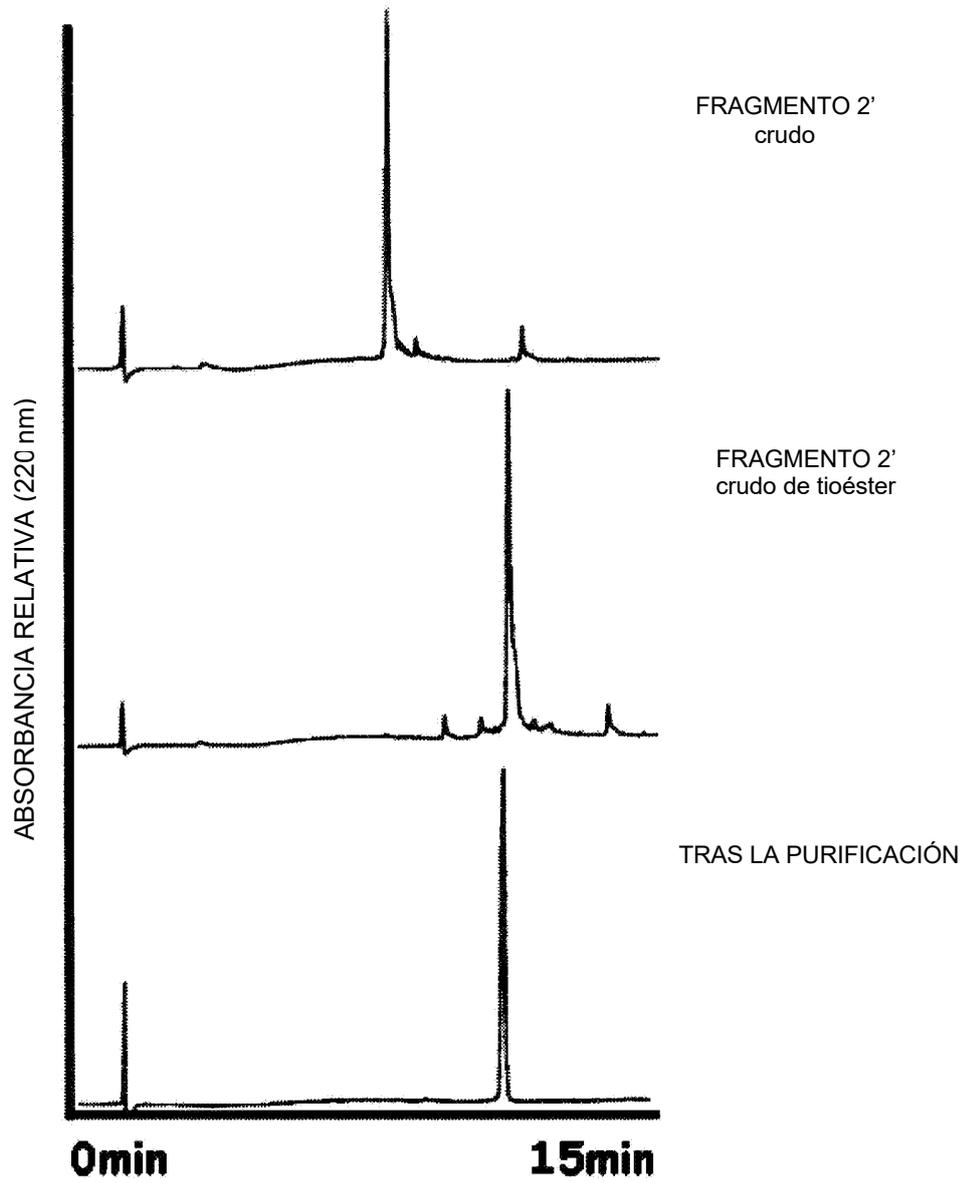


Figura 16

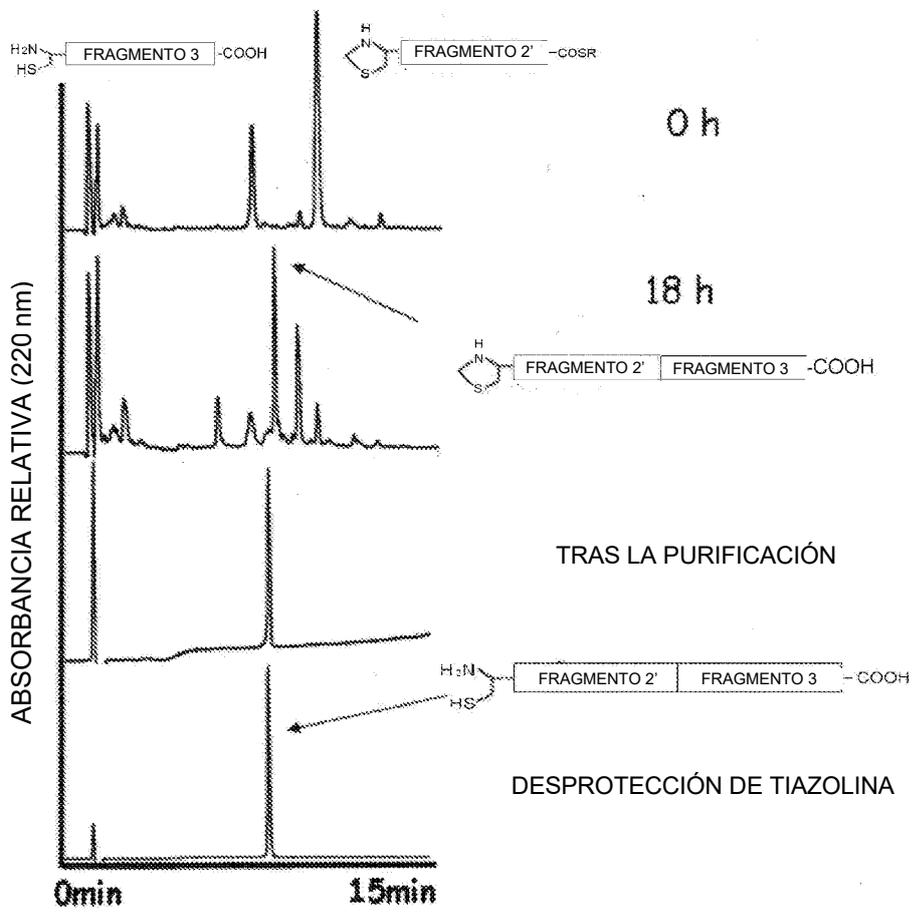


Figura 17

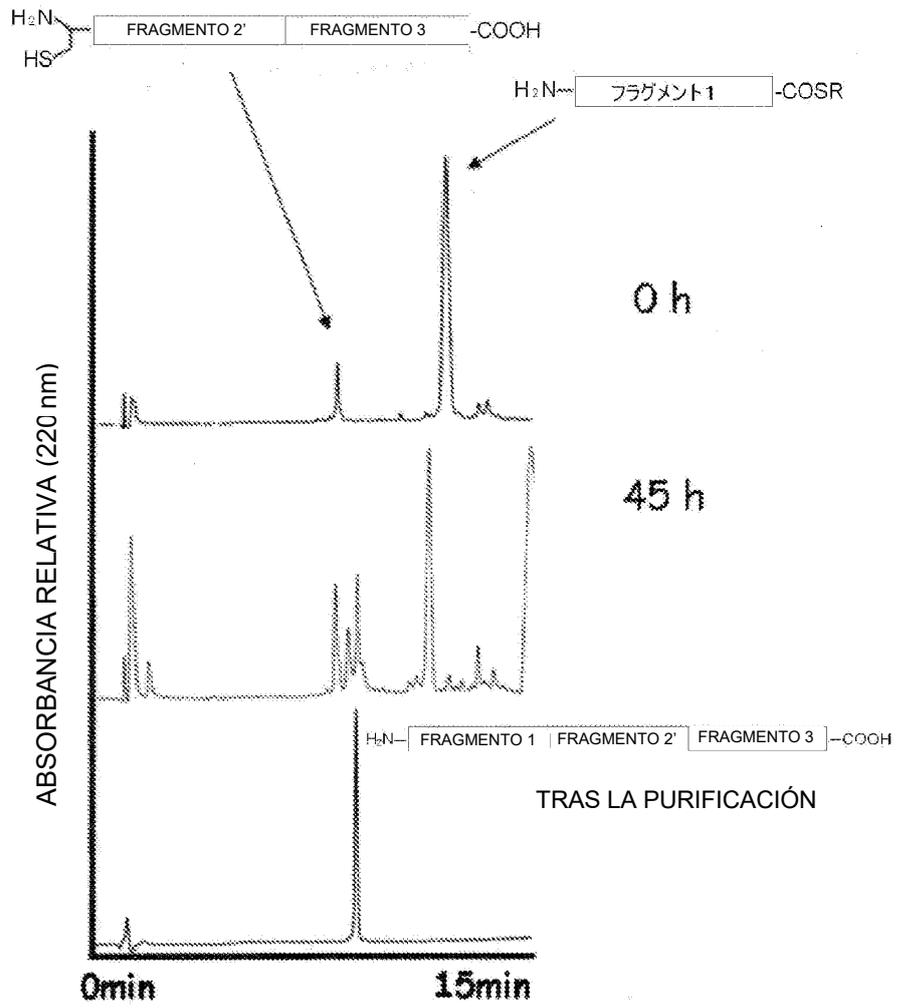


Figura 18

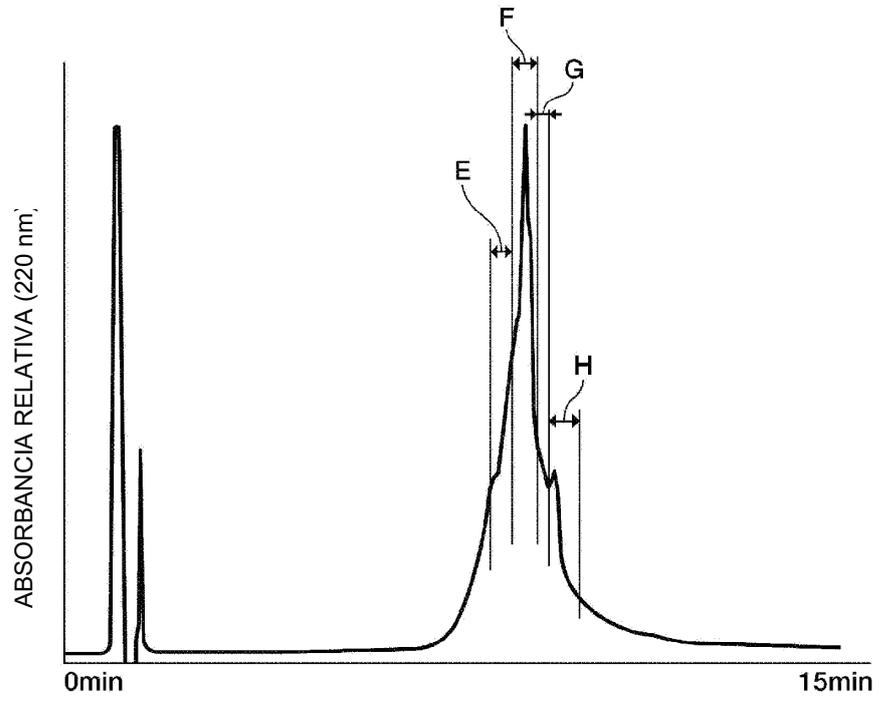


Figura 19

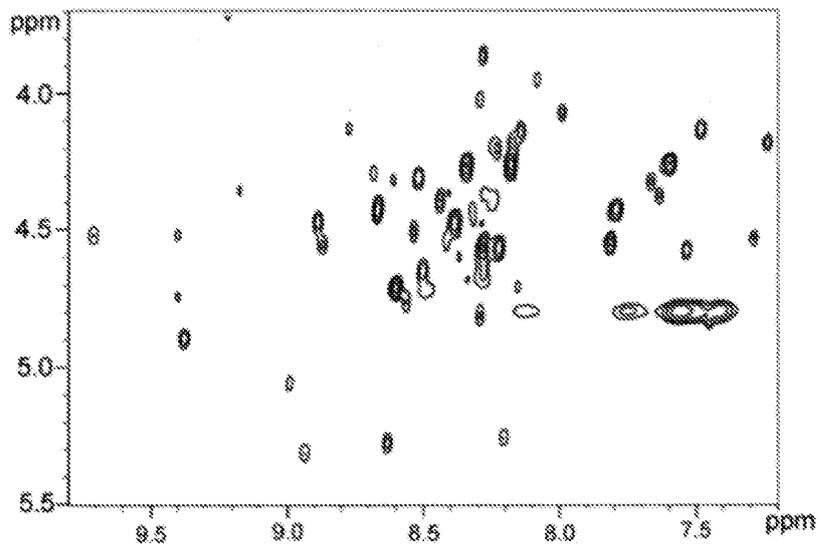


Figura 20

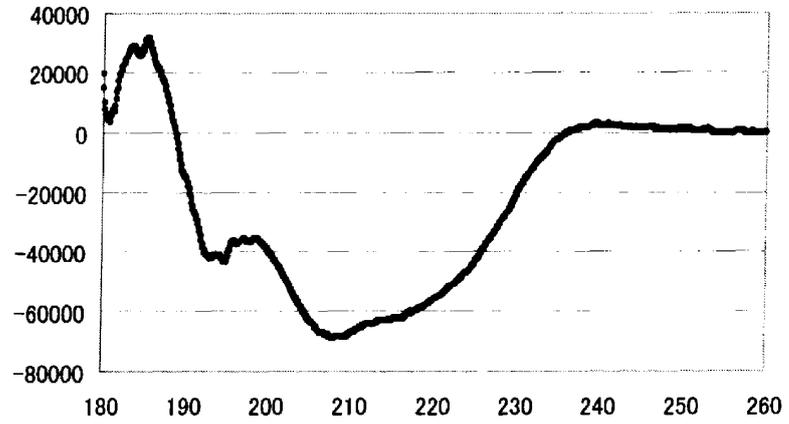


Figura 21

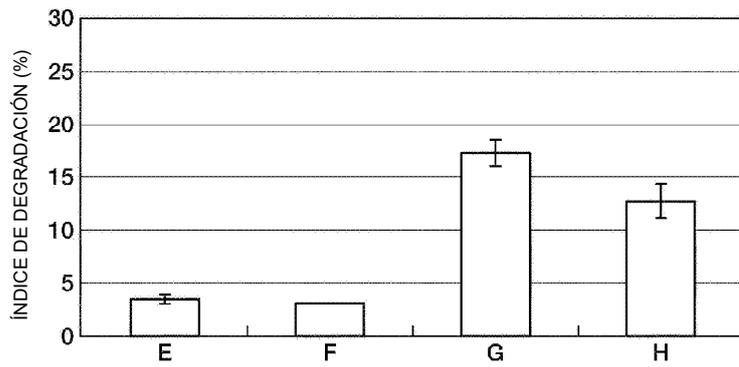


Figura 22

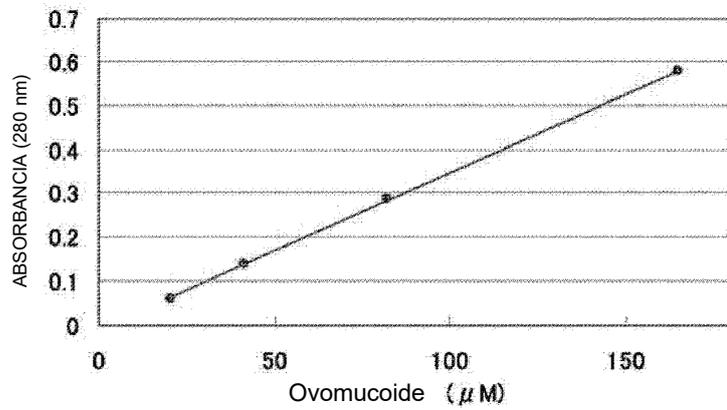


Figura 23

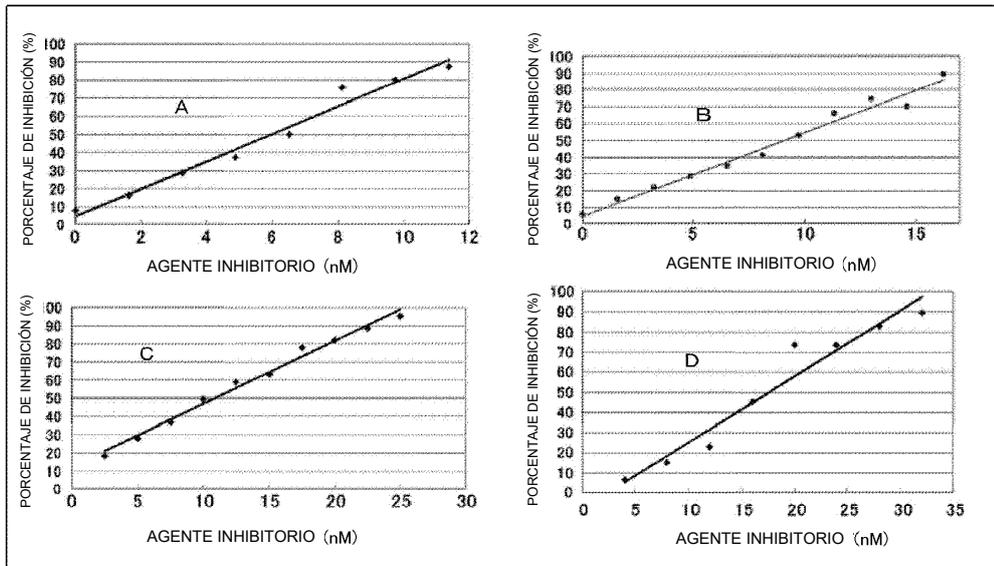


Figura 24

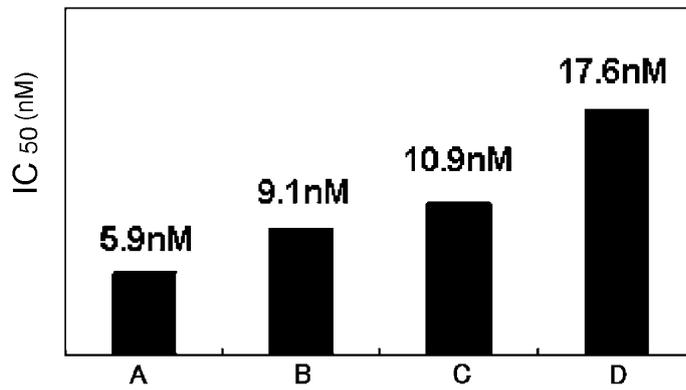


Figura 25

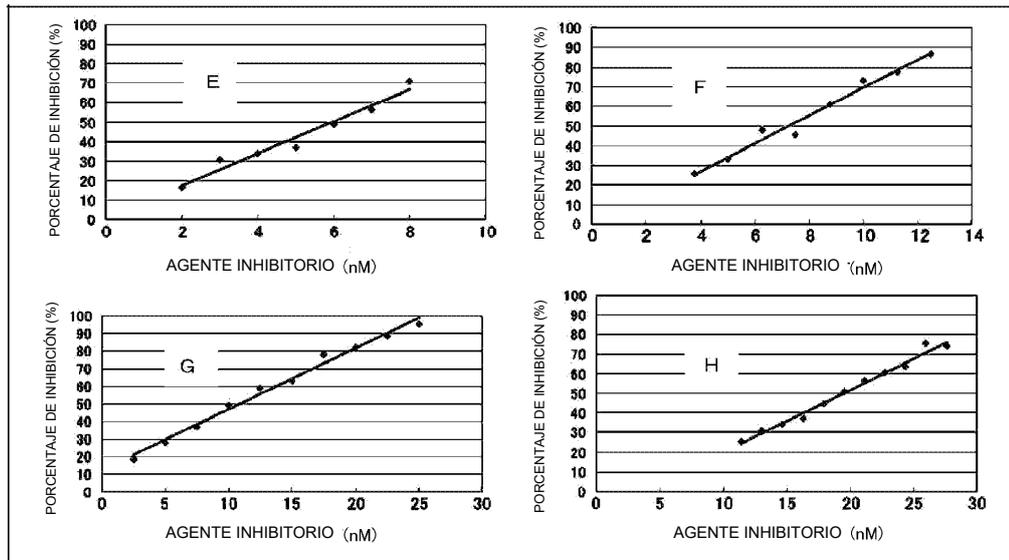


Figura 26

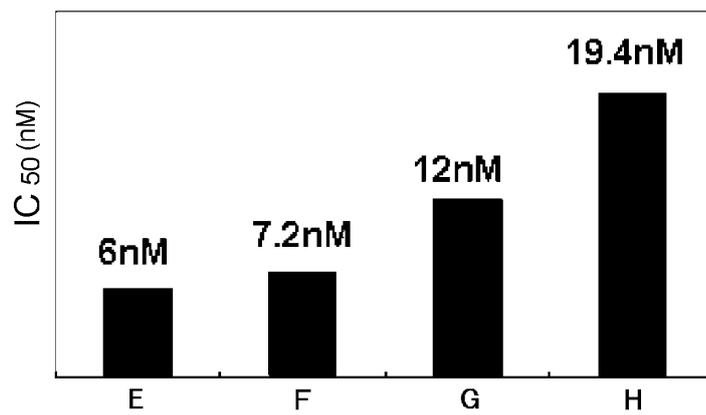


Figura 27

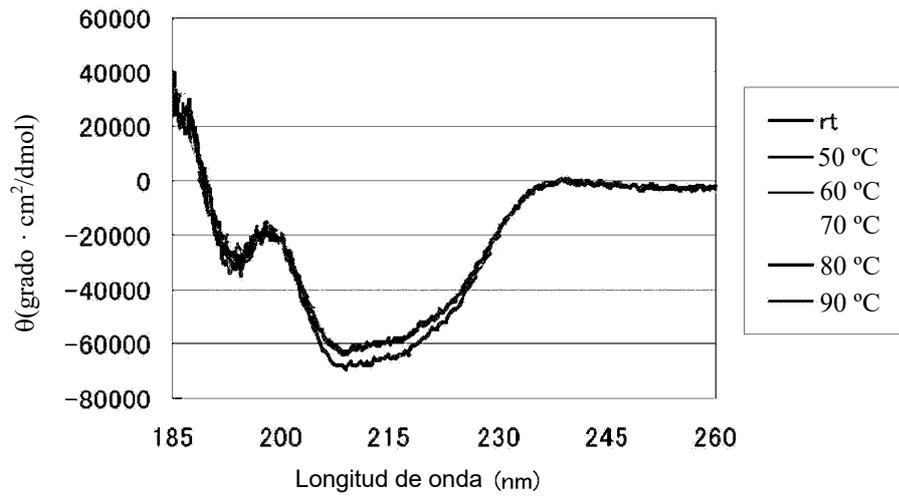


Figura 28

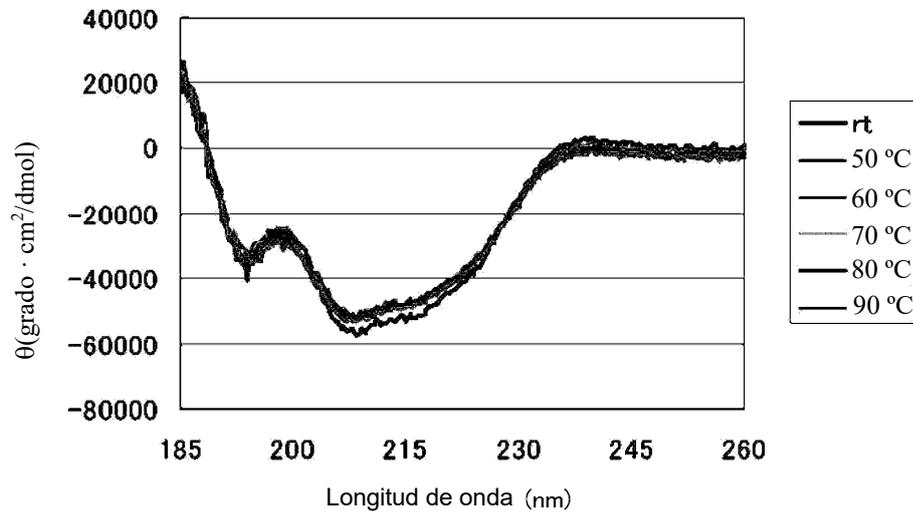


Figura 29

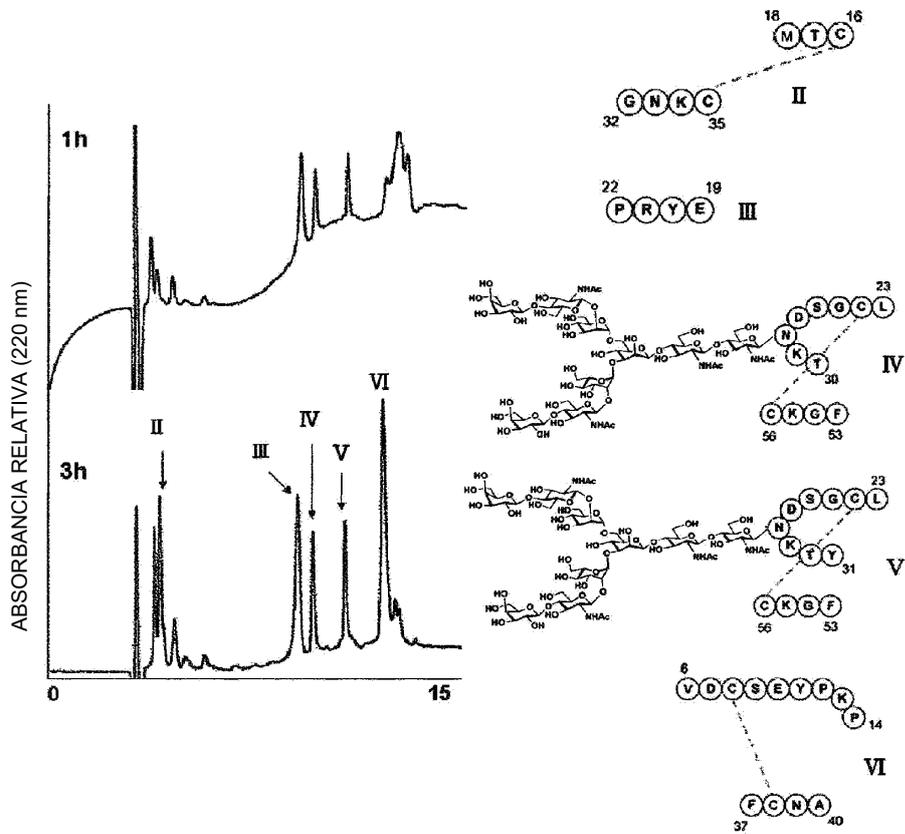


Figura 30

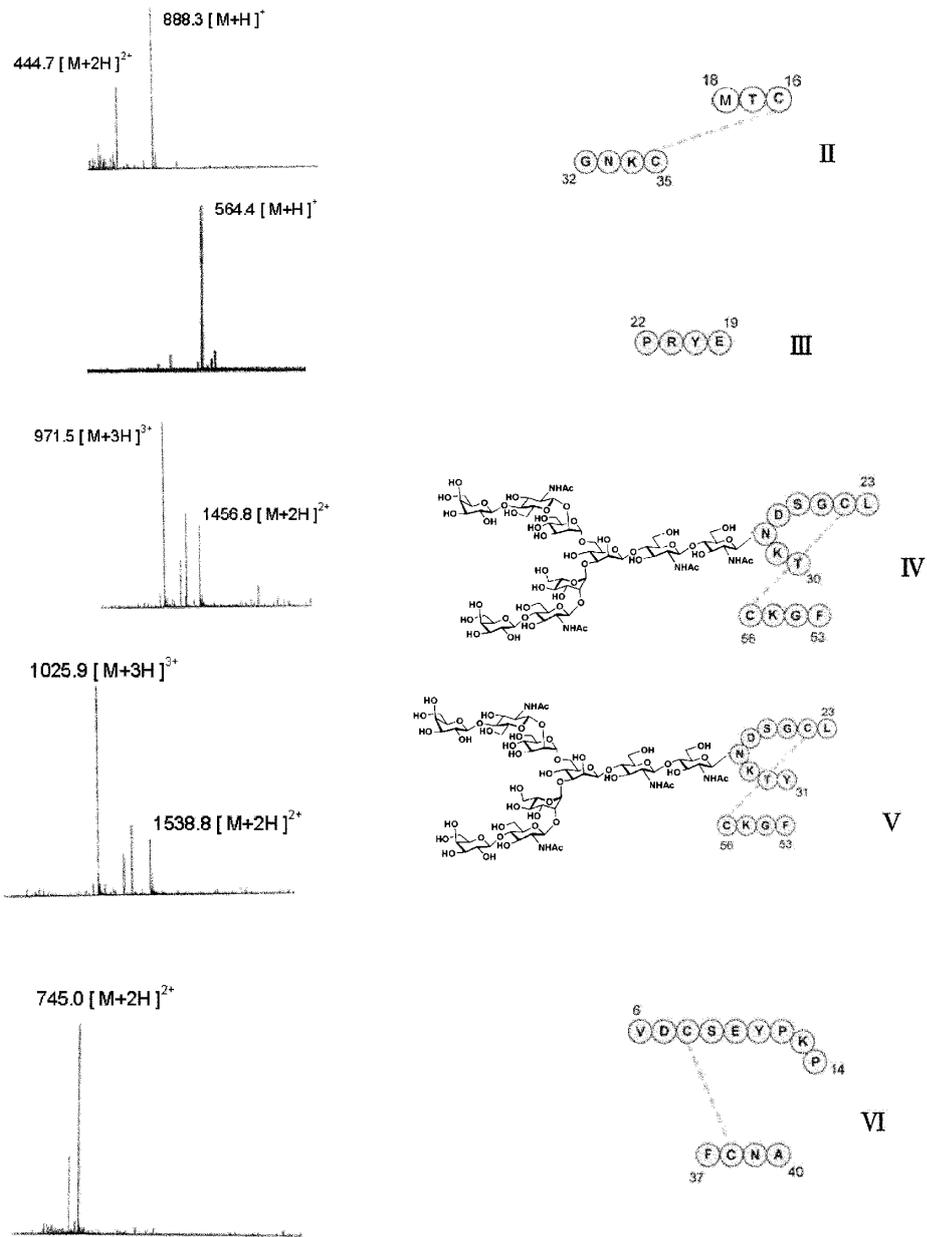


Figura 31

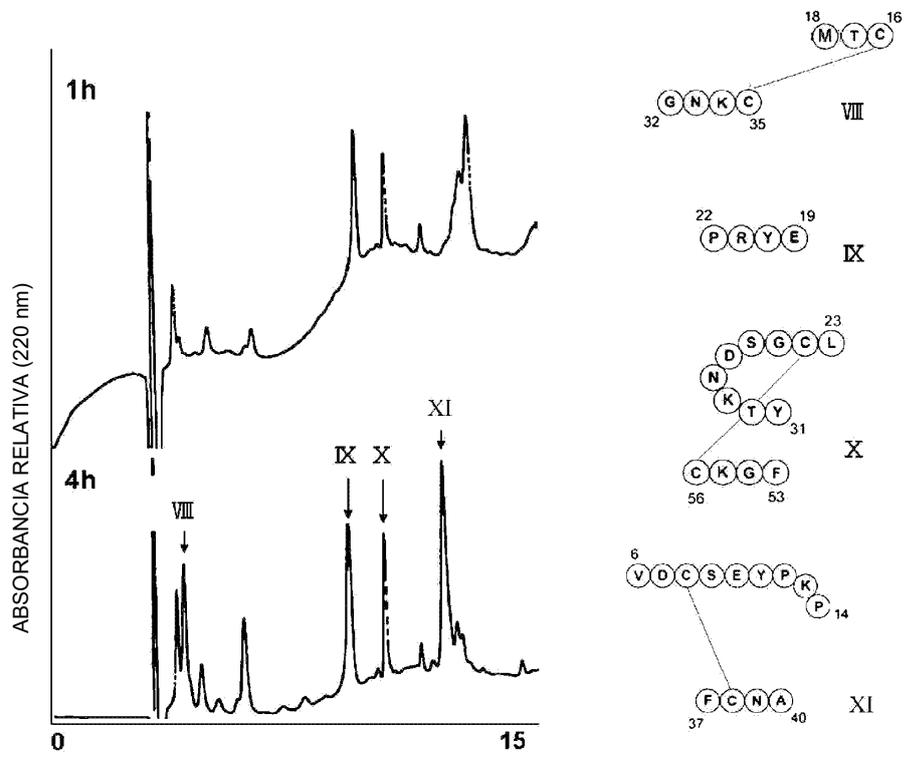


Figura 32

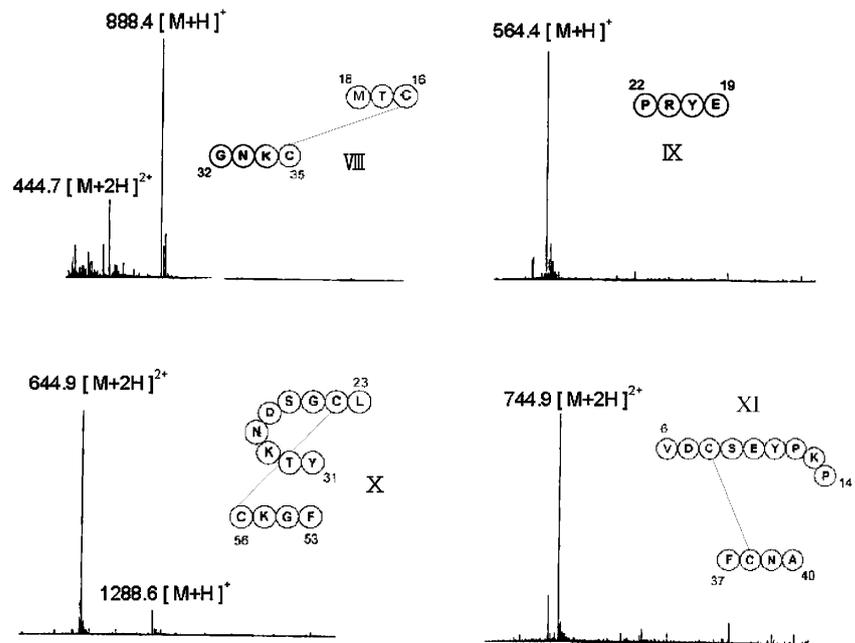


Figura 33

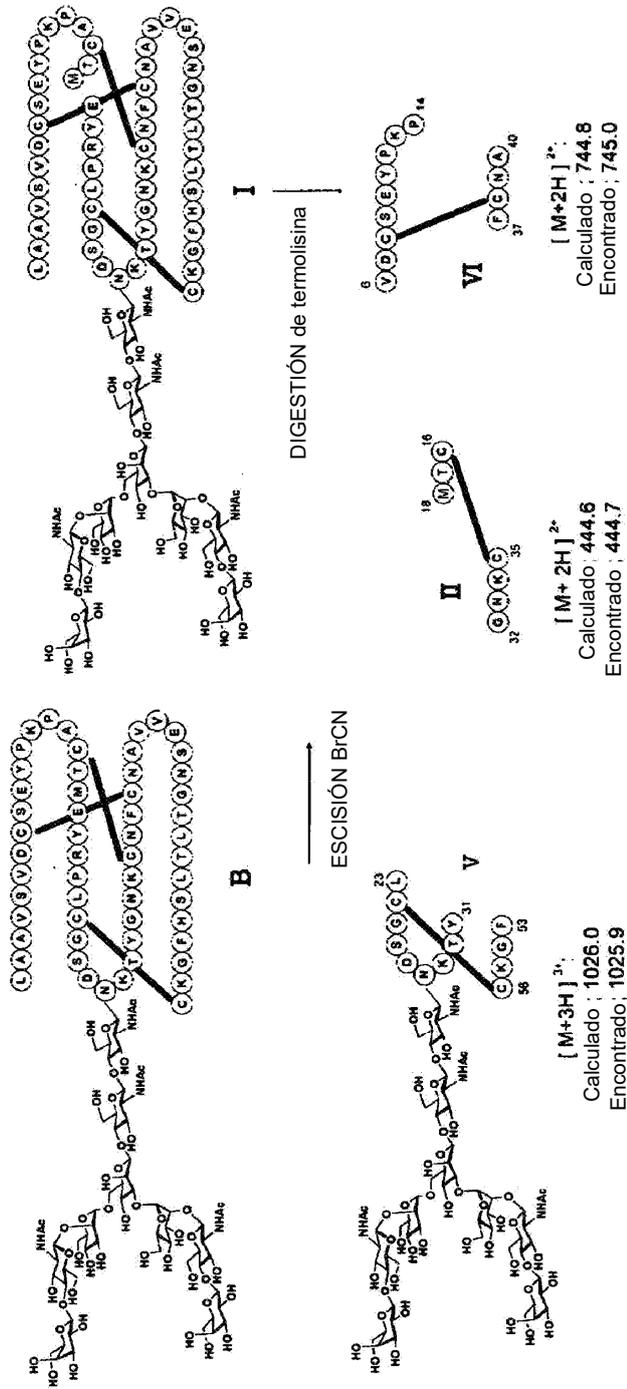


Figura 34

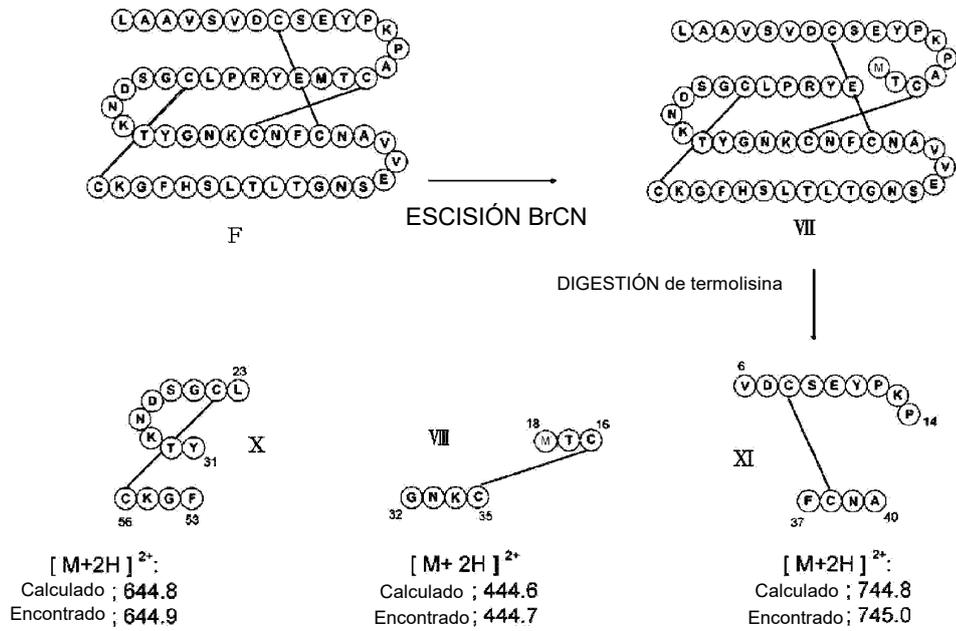


Figura 35

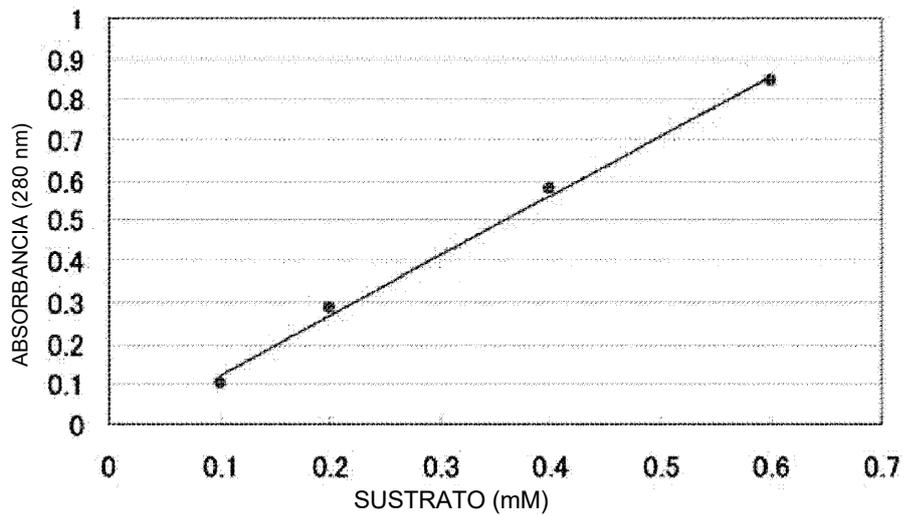


Figura 36

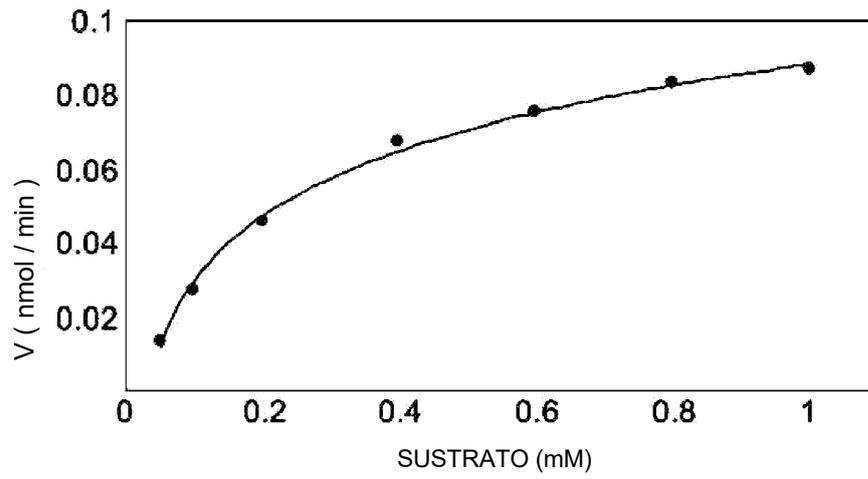


Figura 37

