



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

03-29685

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO

PROCESO PARA DOBLAR POLIPEPTIDOS SINTETIZADOS QUINICAMENTE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

CD7K 1/113

71. SOLICITANTE

RIF DICTABENE S.A.

DOMICILIO

Epalinges, Suiza.

74. APODERADO

LUIS FELIPE CASTILLO SIBSONE

22. BOGOTÁ, D. C.

89 APR 2003

NT

PETITORIO



03 029685 00

REGISTRAR GENERAL
Ejecución: 2002-04-09 09:26:43 Folios: 36
Fecha (R.D): 2002-04-09 09:26:43
Trámite: 011 PCT-PATENT 313 Fase NÚM 411 PRESENTAC
Dependencia: 2.29 División de Patentes CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I

☒

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: RMF DICTAGENE S.A.

Dirección: Chemin des Croisettes, 22

Nacionalidad o domicilio: Epalinges, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 7480 Fax: 28 9267

E-mail: lfcastillo@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 79.387.879 TP 68.995 del
de Bogotá C.S.J.

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Antonio Verdini - Giampaolo Corradin - Mario Roggero

Dirección: Viale g. Marconi 29 - Ch. Praz-Dom-Nicod 12 - Pl. de la Croix-Blanche 25

Nacionalidad o Domicilio: Castrocara Terme - Lausana - Epalinges (Suiza)

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP01/14163Fecha: Noviembre 27, 2001Publicación Internacional No. WO 02/50099 A2Fecha: Junio 27, 2002

6

Título (54) PROCESO PARA DOBLAR POLIPEPTIDOS SINTETIZADOS QUIMICAMENTE

7

Clasificación Internacional (51) C07K 1/113

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen

EP

(32) Fecha

Nov. 27, 2000

(31) Número de Solicitud

204207.5

9

Comprobante de pago N°:

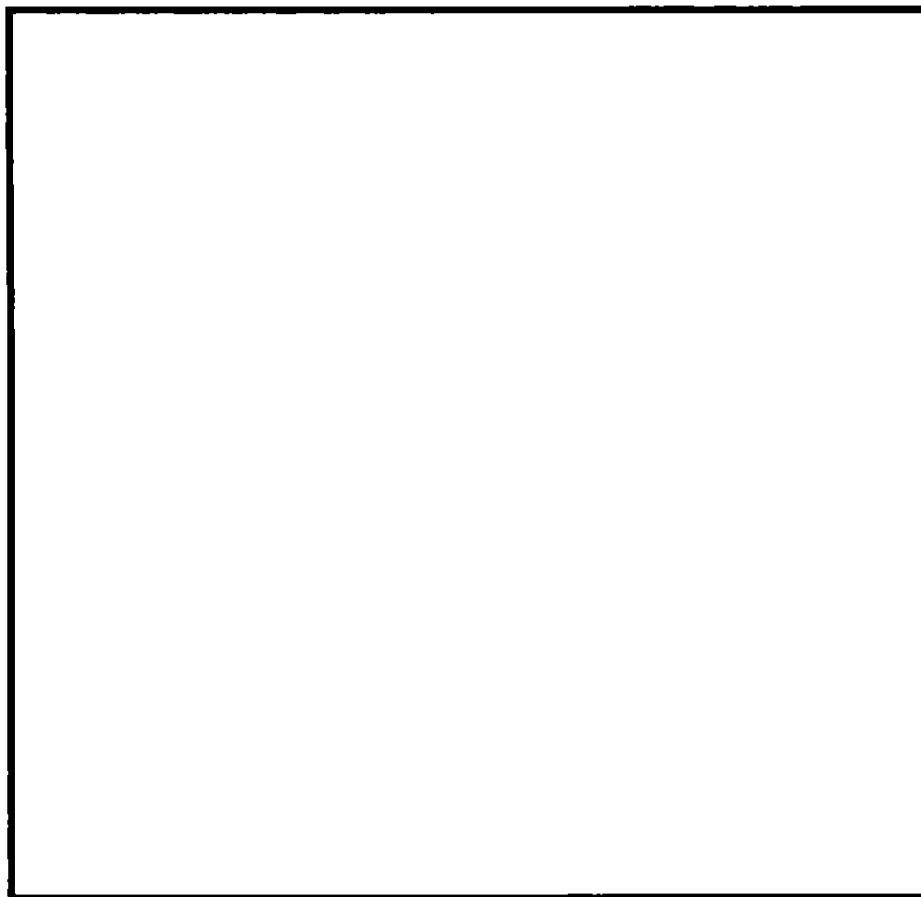
24944

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del Inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

FIRMA:

C.C. 78387.878
de BogotáT.P. No. 68995
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

3
SUPERINTENDENCIA Y COORDINACIÓN
NACIONAL : 03023665
Fecha (m/d/a): 0403-04-03 09:26:43
Folios: 36
Trámite : 011 PATENTE 379 FASE N°1 411 PRESENTAC.
Dependencia: 2120 DIVISION DE LEVANT. CADASTRALES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 24,944
FECHA : ABRIL 8 DE 2003

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO BRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10943349	08/04/2003	2,580,000.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :  _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PROCESO PARA DOBLAR POLIPÉPTIDOS SINTETIZADOS QUÍMICAMENTE

La presente invención se refiere a un proceso para doblar polipéptidos sintetizados químicamente. Además, la invención se refiere a un proceso para producir proteínas biológicamente activas.

A lo largo de los últimos diez años se ha presentado un escalonamiento en la demandas de proteínas sintéticas luego de la síntesis química exitosa de la proteasa VIH completamente activa, una enzima de 99 residuos elaborada por métodos altamente optimizados de síntesis de péptidos de fase sólida (SPPS) basada en el enfoque estándar Boc/Bzl.

La síntesis de ubiquitin cristalino en 1994, una proteína pequeña consistente en 76 residuos, ha demostrado también que las proteínas altamente puras pueden ser sintetizadas por SPPS con base en el protocolo Fmoc/t-Bu, un método operacionalmente más sencillo y químicamente menos complejo que el procedimiento Boc/Bzl.

A partir del 2000, hay una vasta evidencia experimental en el sentido de que las proteínas de dominio simple que contengan entre 60 y 100 residuos aminoácidos pueden ser producidas en forma rápida, confiable y económica mediante síntesis química, con la ayuda de un sintetizador de péptidos, en cantidades suficientes para estudios estructurales y funcionales.

Las proteínas que contienen enlaces de disulfuro preparadas mediante síntesis química, una vez dobladas, tienen las mismas propiedades que las formas naturales y las diseñadas genéticamente. Los enlaces de disulfuro de proteínas forman estructuras cíclicas múltiples intra o inter cadena que imparten considerables restricciones de conformación a las moléculas, contribuyendo de este modo de una manera decisiva a la estabilización de la conformación bioactiva.

Las proteínas dobladas de dominio simple de estructura conocida pueden prepararse mediante el apareamiento regioselectivo de los residuos de cisteína. Se desarrollaron varias combinaciones de grupos protectores de cisteína compatibles con los esquemas de protección comunes para la desprotección y/o cooxidación por pasos y por pares de residuos de cisteína con selectividad completa.

5

Sin embargo, una demostración de qué tan exigente es la química comprometida en el apareamiento regioselectivo de los residuos de cisteína en proteínas que contienen múltiples residuos de cisteína, es la reciente síntesis de un péptido parecido a la insulina: la relaxina humana. La síntesis del precursor de cadena A se hizo utilizando métodos SPPS: el enfoque Fmoc/Bu y una resina basada en alcohol p-alcoxibencílico, mientras que el precursor de cadena B se preparó usando la resina PAM (enlace éster 4-carboxiamidometilbencílico a resina basada en poliestireno) siguiendo el enfoque Boc/Bzl. De los cuatro residuos de cisteína del precursor de cadena A, dos se protegieron como derivados S-Trt (S-trifenilmetil), mientras que los demás tuvieron la protección S-Acm (S-acetamidometil) y S-Meb(S-p-metilbencil), respectivamente. Las dos cisteínas del precursor de cadena B se protegieron por los grupos protectores S-Acm y S-Meb. El enlace intramolecular S-S- de la cadena A se obtuvo primero por oxidación de yodo. Los dos enlaces de disulfuro intermoleculares que conectan las cadenas A y B se obtuvieron en dos pasos: en el primer paso, el tiol libre del precursor de la cadena A, obtenido mediante el desbloqueo de HF del grupo protector S-Meb, se hizo reaccionar con el residuo Cys (Npys) (S-3-nitro-2-piridina sulfenil) de la cadena B (formación dirigida de heterodisulfuro intermolecular) y, en el segundo paso, el enlace restante S-S se obtuvo por la remoción cooxidativa de los grupos S-Acm con yodo.

Los protocolos SPPS ofrecen la posibilidad de preparar mediante síntesis química, una variedad de polipéptidos que contienen residuos de cisteína protegidos con el mismo grupo bloqueador (protector). Cuando los grupos protectores son removidos por un número de reactivos oxidantes, se forman directamente los enlaces de disulfuro. Los polipéptidos y/o las proteínas que contienen cisteínas protegidas con S-Trt o S-Acm pueden ser dobladas de manera eficiente con tratamiento con yodo, N-yodosuccinimida y yoduro de cianógeno bajo condiciones cuidadosamente controladas de solvente, pH y tiempo de reacción que minimicen la modificación de los residuos Tyr, Met y Trp sensibles a oxidación y eviten la sobreoxidación de tioles de cisteína a los ácidos sulfónicos correspondientes.

El trifluoroacetato de Talio (III) puede reenlazar los anteriores agentes oxidantes produciendo en ocasiones mejores rendimientos de enlaces de disulfuro. Las principales limitaciones de este reactivo son su toxicidad, la dificultad para remover el talio del polipéptido objetivo y la necesidad de proteger los residuos Met y Trp contra oxidación.

6

Los reactivos oxidantes que contengan una mezcla de compuestos de sulfóxido/sililo y ácido trifluoroacético han sido aplicados exitosamente para la oxidación directa a enlaces de disulfuro de precursores de polipéptido que contengan residuos de cisteína S-Acm, S-But, S-Meb y S-Mob (S-p-metoxibencilo). La necesidad de proteger el anillo indol Trp con formilo para evitar clorinación bajo condiciones oxidantes es, no obstante, la principal limitación de esta mezcla.

Más populares y más frecuentemente aplicados están los métodos para el doblamiento oxidativo de precursores sintéticos lineales de politiol (formas de polipéptido reducido). En el método más simple, los enlaces de disulfuro adecuados pueden ser formados de manera espontánea en la presencia de aire u otros agentes oxidantes suaves. Además, el doblamiento y apareamiento de cisteína se obtiene en la presencia de la forma reducida (RSH) y oxidada (R-S-S-R) de compuesto de sulfidril de peso molecular bajo.

En polipéptidos sintéticos y pequeñas proteínas consistentes de dominio simple, la fuerza impulsora termodinámica de doblamiento que resulta de una combinación de enlace-H, apareamiento de iones y efectos hidrofóbicos, es aparentemente sustancial como para producir de manera espontánea los isómeros nativos en oxidación renaturante aleatoria.

De estudios del doblamiento oxidativo de múltiples proteínas pequeñas que contienen cisteína, como inhibidores de enzimas, toxinas u hormonas, se han derivado informaciones útiles acerca de motivos estructurales en particular, por ej: α -turn estabilizado por cisteína, pliegue poli(Pro)-II helix estabilizado con cisteína y pliegue estructural α - α estabilizado por cisteína, cuya estabilización es la principal fuerza impulsora para el correcto enlace de disulfuro aún en moléculas de péptidos relativamente pequeñas. Si se pone atención a la escogencia de amortiguadores, la temperatura y los aditivos que estabilicen los motivos estructurales secundarios, entonces luego se puede obtener in vitro el completo doblamiento correcto de proteínas dobladas o revueltas parcialmente (mal dobladas).

Se ha diseñado un número de protocolos de doblamiento para especies de polipéptido de politiol para minimizar el incorrecto apareamiento de cisteína intramolecular que lleva a isómeros no nativos, mal doblados y para evitar en lo posible la formación de enlaces de disulfuro intermolecular aleatorio que promuevan la agregación y la precipitación.

7

Por ello, la oxidación de aire se hace generalmente a alta dilución de la forma polítiol del precursor (1mg/ml o menos) bajo condiciones neutrales o levemente alcalinas. Usualmente se requiere una larga duración y produce en la reacción un subproducto inocuo como el agua. Sin embargo, las oxidaciones de aire son difíciles de controlar debido a que cantidades de trazos de iones metálicos influyen fuertemente sus tasas. Más importante, las moléculas básicas e hidrofóbicas del precursor básico tienden a agregar y a precipitar la solución en o cerca de sus puntos isoelectricos básicos o neutrales durante el proceso de doblamiento. Además, los productos secundarios causados por la oxidación de Met se acumulan durante el doblamiento. Aunque el número de operaciones químicas necesarias para doblar los precursores de polítiol se reduce a un mínimo, la formación de los enlaces de disulfuro que promueve el oxígeno molecular de aire da en muchos casos bajos rendimientos, y en ocasiones no se dan del todo.

También se han usado como oxidantes DMSO y ferricianuro potásico. Sin embargo, el ferricianuro potásico debe usarse a oscuras, y, si Met y Trp están presentes en la cadena de polipéptidos, los productos secundarios de oxidación se acumulan durante el doblamiento. El uso de DMSO ofrece frecuentemente mejores resultados debido al hecho de que los doblamientos oxidativos pueden hacerse bajo condiciones ácidas a una tasa eficiente sin productos nocivos en la reacción. El método es especialmente adecuado para doblar precursores básicos e hidrofóbicos de polipéptido debido a las características de solubilidad más alta de especies que pasan por oxidación en amortiguadores ácidos. Sin embargo, se han reportado frecuentemente problemas para la remoción de DMSO del producto final y reducción en la selectividad de la formación de enlaces de disulfuro. Además, revolver los enlaces de disulfuro lleva a isómeros mal doblados y no siempre se puede evitar la oligomerización, aún con un control cuidadoso de las condiciones experimentales.

Rendimientos más altos de apareamiento y doblamiento correctos de cisteína en precursores de polítiol de proteínas pequeñas se obtienen con mayor frecuencia mediante el uso de amortiguadores redox (reducción-oxidación) tales como glutatona oxidada (GSSG) y reducida (GSH) y cisteína/cisteína (Cys/Cys).

Así, durante los doblamientos oxidativos de Ribonucleasa A (R.R. Hatgan y colaboradores, *Biochemistry* 13, 613, 1974), el dominio central de 49 aminoácidos de Hirudin (B.Chatrenet y J.Y. Chang *J. Biol. Chem.* 267, 3038, 1992) y *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI) (T.E. Creighton *Methods Enzymol.* 131, 83,

46

1986) inducidos mediante GSSG/GSH o Cys/Cys, se forman constantemente a lo largo del proceso de doblamiento grupos de sulfidrilos y disulfuro libres. Generalmente, las tasas y los rendimientos totales son mejores que el doblamiento oxidativo en aire puesto que el intercambio tiol/disulfuro que ocurre en los intermediatos de tiolato facilita volver a mezclar el disulfuro no nativo en natural. En cuanto a doblamiento oxidativo en aire, se requiere la alta dilución del precursor de politiol para evitar la agregación, formación de oligómeros y polímeros y para maximizar los rendimientos de las especies de las proteínas objetivo.

Durante la primera etapa de doblamiento in vitro de Hirudin¹⁻⁴⁹, el doblamiento procede en forma secuencia e irreversible de la forma desdoblada y reducida (politiol) a isómeros equilibrados que contienen uno y dos enlaces de disulfuro y a especies equilibradas que contienen tres enlaces de disulfuro (isómeros revueltos) (J.Y. Chang *Biochem. J.* 300, 643, 1994). Se han identificado casi todas las 75 especies de proteínas posibles, incluidas las nativas: 15 isómeros con un enlace S-S, 45 isómeros con dos enlaces S-S y 15 isómeros con tres enlaces S-S. Durante la segunda etapa del doblamiento, las especies revueltas se reorganizan volviendo a mezclar los disulfuros no nativos para lograr las especies de proteína nativa. La formación de disulfuro se promueve principalmente mediante glutatona o cisteína oxidada, mientras que la remezcla de disulfuro requiere un catalizador de tiol, como glutatona o cisteína reducida o mercaptoetanol.

Aparentemente, la efectividad de los reactivos de tiol para promover la remezcla, tiene relación con su potencial redox (reducción-oxidación) y cada catalizador presenta una concentración óptima. Cisteína/cistina es aproximadamente 10 veces más potente que GSSG/GSH en el proceso de acumulación de Hirudinas mezcladas. Esta diferencia se ha explicado por el potencial redox relativo de los sistemas GSSG/GSH (-0,24 V) y Cys-Cys/Cys (-0,22 V). Al seleccionar una combinación de las condiciones óptimas (temperatura amortiguador, sales y mezcla redox) el proceso de doblamiento de Hirudina¹⁴⁹ se aceleró hasta el grado que alcanzó su terminación dentro de un periodo de 15 minutos.

Por lo general, la conformación nativa de una proteína sintética que contiene varios enlaces de disulfuro debe formarse espontáneamente bajo condiciones óptimas para el doblamiento de formas de politiol. Sin embargo, en muchos casos, aún en condiciones optimizadas, los doblamientos oxidativos

A

mediados por el redox anterior amortigua una cantidad considerable de subproductos y se producen formas no concordantes. Este es especialmente el caso en proteínas que tienden a formar la conformación nativa solo en la superficie de membranas específicas o con la ayuda de un chaperón molecular específico (S. Sakakibara *Biopolymers*, Peptide Science 51, 279, 1999).

Además, a pesar de su amplio uso, la mayoría de los doblamientos oxidativos de los precursores de politiol promovidos por aire o los pares redox GSSG/GSH y cisteína/cisteína se han hecho a manera de prueba y error, como claramente los demuestran los experimentos de doblamiento de quimiocina sintética y análogos de quimiocina. De hecho, si bien las quimiocinas nativas y un número de sus análogos se doblan rápidamente, la estructura doblada siendo estabilizada por dos o tres enlaces de disulfuro, varios análogos no se doblan bien bajo las mismas condiciones como las correspondientes moléculas nativas que resultan en formas dobladas parcialmente. Estas observaciones representan una firme indicación en el sentido de que los cambios en la estructura primaria de los precursores de politiol pueden afectar en forma adversa la inducción de doblamientos locales correctos (α -turns motivos helicales de polipirolina, etc.) en las cadenas de polipéptidos que se vayan a doblar. De aquí que la propensión para doblar muchos precursores de tiol es principalmente una propiedad intrínseca de la cadena de polipéptidos en lugar de una función del sistema de oxidación específico de actuar en las moléculas.

También se ha reportado el mejoramiento de apareamientos seleccionados de disulfuro mediante la adición de alcoholes, acetonitrilo y DMSO a amortiguadores a baja intensidad iónica. Esta estrategia implica realzar la formación de enlaces de disulfuro específicos ajustando los factores electrostáticos en el medio para favorecer la yuxtaposición de aminoácidos cargados opuestamente que bordean los residuos de cisteína seleccionados.

Enzimas tales como peptidilo disulfuro isomerasa (PDI) y prolijo isomerasa (PPI) también se han empleado como aditivos para catalizar y modular el intercambio de disulfuro. El tiempo requerido para doblar Hirudin in vitro puede acortarse de 10 horas a 30 segundos si se agrega PDI al amortiguador del redoblamiento. En este caso, la eficiencia de doblar in vitro no se difiere significativamente de la observada in vivo.

Los precursores de polipéptidos de politiol se obtienen directamente mediante la separación acidolítica polipéptido-resina cuando los residuos de cisteína están protegidos por grupos ácido-lábiles, por ej: Trt. Alternativamente, y

preferiblemente, los polipéptidos en los cuales todas las cisteínas están protegidas por un grupo resistente a ácidos, por ej: el grupo acetamidometil (Acm) son aisladas primero como derivados de S-cisteína mediante la separación acidolítica péptido-resina y luego el grupo Acm es eliminado mediante tratamiento con $\text{Hg}(\text{AcO})_2$ en ácido acético, seguido por la remoción de iones Hg por filtración de gel en presencia de una gran cantidad de mercaptoetanol.

Sin embargo, en ambos casos se ha reportado que varias reacciones secundarias se presentan en los residuos de cisteína y triptofan. El anillo indol de triptofan puede derivarse por mercaptoetanol y la cisteína da un número de reacciones secundarias, la más importante siendo la oxidación y la alquilación de cationes de t-butilo durante la remoción acidolítica de la cadena de polipéptidos de la resina.

Por ello, debido a las fallas en las metodologías actuales, existe la necesidad de procesos más simples y más eficientes para doblar los polipéptidos sintetizados químicamente, y para preparar proteínas biológicamente activas mediante síntesis química.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proveer un proceso eficiente, simple y rápido para doblar polipéptidos y/o proteínas, en el cual, entre otras cosas se minimiza la formación de isómeros que contengan enlaces de disulfuro no concordantes y se omite el uso de costosos reactivos de remezcla de disulfuro tales como glutatona o enzimas; dicho método se puede repetir, es sólido y escalable. Estos y otros objetos serán aparentes para las personas versadas en la técnica.

Este objeto es logrado por la invención mediante la provisión de un proceso para doblar polipéptidos sintetizados químicamente, que comprende tratar un polipéptido que comprenda dos o más residuos derivados de cisteína con un agente reductor en un amortiguador de doblamiento que tenga un pH y una temperatura predeterminados.

Se provee además un proceso para la preparación de proteínas biológicamente activas, que comprende:

(a) sintetizar químicamente un polipéptido que comprenda dos o más residuos derivados de cisteína;

(b) tratar dicho polipéptido con un agente reductor en un amortiguador de doblamiento que tenga un pH y una temperatura predeterminados; y

(c) purificar las proteínas dobladas obtenidas.

Preferiblemente, el residuo derivado de cisteína corresponde a un residuo S-butilo-tio-cisteína (S-t-Bu). Por ello, según la invención, inesperadamente se ha descubierto que las cisteínas derivadas S-t-Bu pueden ser desprotegidas, es decir, perder el medio S-t-Bu mientras forman enlaces de disulfuro con otras cisteínas cuando son incubadas en un amortiguador de doblamiento adecuado a una temperatura y pH adecuados.

Según la presente invención, el agente reductor es preferiblemente cisteína libre. Al amortiguador se le puede agregar un exceso de cisteína (como por ejemplo según se ilustra en los Ejemplos 1 a 5), o la cisteína se puede derivar de dentro del polipéptido (tal como se ilustra en el Ejemplo 6).

En una realización preferida del proceso de la invención, el amortiguador de doblamiento comprende una o más sales caotrópicas con el fin de llevar al polipéptido a condiciones de equilibrio que permitan que ocurra el doblamiento natural. Esto se puede lograr por ejemplo colocando el polipéptido y/o la proteína en condiciones de completa desnaturalización, por ejemplo por alta concentración de las sales caotrópicas, y luego diluyendo la sal caotrópica a una concentración más baja para el doblamiento. Preferiblemente, las sales caotrópicas se escogen del grupo compuesto por cloruro de guanidinio y úrea, y preferiblemente, están presentes en una concentración de 0,1 a 1M durante el doblamiento.

Preferiblemente, la temperatura del amortiguador de doblamiento es entre 25° y 40°C, más preferiblemente entre 27°C y 38°C, con el fin de disminuir los cambios de la degradación del péptido, correspondiendo al mismo tiempo a las temperaturas naturales del cuerpo. Más preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 37°C durante el doblamiento.

De acuerdo con otra realización preferida del proceso de la invención, el amortiguador de doblamiento tiene un pH levemente alcalino. Preferiblemente, el pH es entre 7 y 9, más preferiblemente entre 7 y 8,5 con el fin de promover el proceso del doblamiento. Como se puede deducir de lo anterior, el doblamiento de proteínas depende de un conjunto complejo de interacciones. Por ejemplo, la reacción con cisteína no ocurre con un pH ácido y los valores pH más altos aumentan el riesgo de degradación del polipéptido.

Luego del doblamiento, las proteínas identificadas pueden ser purificadas por métodos conocidos en la técnica, incluida cromatografía de intercambio de aniones y cationes, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de

2

fase inversa, cromatografía de afinidad, Cromatografía de Interacción Hidrofílica/Intercambio de Cationes (HILIC/CEC), Cromatografía de Desplazamiento (DC) y Cromatografía de Desplazamiento de muestras (SDM). Más preferiblemente, (fase inversa), se emplea cromatografía de alto rendimiento en elusión, así como la cromatografía de desplazamiento.

En una realización preferida del proceso para producir proteínas biológicamente activas, el proceso comprende los pasos de:

(a) ensamblar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tio en un soporte polimérico insoluble mediante elongación de cadena por pasos;

(b) separar dicha cadena de polipéptido de cisteína S-t-butil-tio de dicho soporte mediante acidólisis;

(c) purificar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tio obtenido;

(d) doblar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tiol purificado tratando dichos polipéptidos con un exceso molar de cisteína en un amortiguador de doblamiento que comprende una sal caotrópica, preferiblemente cloruro de guanidinio, y con un pH alcalino y una temperatura entre 37°C y

(e) purificar las proteínas dobladas obtenidas por mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) de fase inversa.

En una realización útil del proceso de la invención, el soporte polimérico es una polamida o una resina basada en poliestireno funcionalizada con el enlazador de ácido hidroximetilfenoxiacético lábil, ya que estos soportes pueden usarse adecuadamente para los sintetizadores de péptidos completamente automatizados, y generalmente, permiten la síntesis de largas cadenas de polipéptidos.

Tal como se explicó arriba, la presente invención se basa en el ensamble de fase sólida por pasos de polipéptidos de cisteína S-t-butil-tio y en el hallazgo de que se pueden producir cantidades considerables de proteínas nativas, biológicamente activas sometiendo a que dichos polipéptidos se doblen en la presencia de un agente reductor, preferiblemente cisteína, a un pH levemente por encima de neutro y a una temperatura aproximada de 37°C.

Sorprendentemente se ha descubierto que la producción de proteínas biológicamente activas se logra con un alto exceso molar de cisteína en un procedimiento que retire el grupo protector S-t-butil y al mismo tiempo permita la

formación del enlace de disulfuro. Este tipo de procedimiento es más simple y más eficiente que los procedimientos que se describen en la técnica anterior para el doblamiento de polipéptidos que contengan cisteína, los cuales se obtienen mediante síntesis química. La remoción del S-t-but ocurre dentro del mismo paso del doblamiento del polipéptido.

Alternativamente, también se puede obtener el mismo material doblado mediante una combinación de la cisteína S-t-butil-tio y la cisteína protegida con grupos ácidos-lábiles en posiciones seleccionadas de la cadena de polipéptidos para obligar la formación de enlaces de disulfuro adecuados sin necesidad de una adición extra de un agente reductor al amortiguador de doblamiento. En este caso, los grupos ácidos-lábiles son removidos cuando el polipéptido es separado de la resina a un pH ácido. De este modo se generan cisteínas libres, que a la vez actúan como "agente reductor" intramolecular para permitir la remoción de S-t-butil y la formación de disulfuro (tal como se ilustra en el Ejemplo 6).

La esencia de la presente invención se basa en:

- el ensamble rápido de cadenas de polipéptidos S-tio-t-butiladas en el soporte polimérico;
- el intercambio de disulfuro-tio catalizado por cisteína de los derivados en condiciones levemente alcalinas que llevan a polipéptidos cisteinilados que son las formas macromoleculares oxidadas (proteína-S-S-cisteína; polipéptido-S-S-cisteína) del par clásico reducción-oxidación (redox) cisteína/cisteína;
- la concentración de la forma oxidada macromolecular que permanece constantemente baja durante el proceso de doblamiento de modo que se minimice el intercambio de disulfuro intermolecular; y
- la falta de agregación de intermediatos mal doblados debido a una formación preferencial y rápida de formas con pares correctos de cisteína (estructura nativa).

Por ejemplo, de acuerdo con el proceso de la presente invención para doblar polipéptidos, en el primer paso, se disuelven 10 mg del derivado S-t-butil a temperatura ambiente en 1 ml de un amortiguador, pH 8,0, que comprende 6 M de cloruro de guanidinio, 10 mM Tris y 0,1 M Na_2HPO_4 y la solución que resulte es mantenida a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. En el segundo paso, la solución es primero diluida 10 veces con agua a un pH de 7,2, (0,6 M cloruro de guanidinio, 1,0 mM Tris, 10 mM Na_2HPO_4 , y una concentración

final del derivado del polipéptido 1 mg/ml) y luego se le agrega agitando un fuerte exceso molar de cisteína (aproximadamente 100 veces la concentración del polipéptido o derivado de proteína. La temperatura es aumentada gradualmente a 37°C y se mantiene constante durante cerca de 24 horas con el fin de permitir que ocurra el doblamiento del polipéptido.

El proceso de doblamiento de la presente invención resulta en un producto altamente homogéneo y es aplicable, solo con modificaciones menores, a cualquier polipéptido que sea producido mediante síntesis química de fase sólida como el derivado de cisteína tio-t-butil. Además, el proceso según la invención, tiene otra serie de ventajas sobre el proceso de la técnica anterior, pues emplea formas precursoras de politiol, tales como:

- los residuos de cisteína de la cadena no son alquilados durante la separación acidolítica de la resina de polipéptidos;
- no ocurre ni la sobreoxidación de cisteína a ácido sulfónico ni la oxidación que lleva a la formación del enlace intermolecular de disulfuro;
- se evita el riesgo de la derivación del anillo indol Trp por mercaptoetanol, la cual es necesaria para eliminar iones Hg contaminantes derivados del desbloqueo de Acm con $\text{Hg}(\text{AcO})_2$. De hecho, el tiolato de cisteína en la mezcla de doblamiento de la presente invención no modifica por nada el Trp;
- los residuos Met, Trp y Tyr sensibles a oxidación no se modifican durante el doblamiento;
- los costos de producción de los productos doblados finales son generalmente más bajos si se comparan con los que emplean polipéptidos de politiol y amortiguadores de reducción-oxidación (redox).

Para la persona versada en la técnica será aparente que, aunque las proteínas identificadas son preparadas generalmente en alto rendimiento usando el proceso de la presente invención, en algunos casos, por ej en el caso de proteínas complejas con múltiples enlaces de disulfuro, una cierta población de formas intermedias que no han evolucionado completamente a la estructura nativa (especies mal dobladas) pueden permanecer en solución en equilibrio. Las especies mal dobladas se pueden separar fácilmente de las especies dobladas correctamente mediante RP-HPLC y someterlas nuevamente a las condiciones de doblamiento de la presente invención para aumentar el rendimiento total del proceso.

6

Según la invención, la expresión "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos ligados por enlaces de amino. La expresión "proteína" se refiere a las especies de polipéptidos en su forma tridimensional, como las que ocurren en las células y fluidos biológicos de organismos vivos. Por ejemplo, las proteínas pueden consistir de cadenas simples de polipéptidos doblados o pueden ser estructuras complejas consistentes de cadenas múltiples de polipéptidos doblados.

Los siguientes Ejemplos y figuras se proveen para ilustrar la presente invención y su intención no es limitar la invención fuera de las limitaciones que se establecen en las reivindicaciones.

La Figura 1 muestra el perfil HPLC antes de remover el S-t-Butil y doblamiento de hu-I-309 (Ejemplo 4).

La Figura 2 muestra el resultado de la determinación de masa del producto de la Figura 1.

La Figura 3 muestra el perfil HPLC de hu-I-309 doblado y desprotegido (Ejemplo 4), que demuestra un tiempo de retención más corto.

La Figura 4 muestra el resultado de la determinación de masa del producto de la Figura 3.

La Figura 5 muestra el resultado de la determinación de masa del producto de la Figura 3, luego de tratamiento con NEM. No se observa ningún cambio en la masa en comparación con la Figura 4, indicando la ausencia de grupos -SH libres.

La Figura 6 es un gráfico de la comparación entre la actividad biológica del recombinante I-309 y el I-309 sintético doblado de la presente invención. La actividad biológica se evaluó mediante el enlace de quimiocina, marcada con ^{125}I a linfocitos humanos.

La Figura 7 muestra el perfil HPLC analítico de la proteína del Ejemplo 5 luego del doblamiento.

La Figura 8 muestra el perfil HPLC preparativo de la proteína doblada del Ejemplo 5.

La Figura 9 muestra el resultado de la determinación de masa del producto purificado del Ejemplo 5, demostrando el peso molecular esperado.

La Figura 10 muestra el perfil HPLC del polipéptido del Ejemplo 6 antes de la remoción y doblamiento de S-t-Butil.

La Figura 11 muestra el resultado de la determinación de masa del polipéptido de la Figura 10 (M=H).

La Figura 12 muestra el perfil HPLC de la proteína del Ejemplo 6 después del doblamiento, demostrando un tiempo de reacción más corto.

La Figura 13 muestra el resultado de la determinación de masa de la proteína de la Figura 12 (M=H), demostrando el peso molecular esperado.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Síntesis y doblamiento de Cys^{10,11,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC (timo y quimiocina regulada por activación).

Se ensambló el derivado de quimiocina del residuo de 71 aminoácidos en un Sintetizador Péptido A 433 (Perkin Elmer/EBI) usando la química Fmoc/t-Bu y una resina basada en poliestireno funcionalizada con el enlazador de ácido hidroximetilfenoxiacético lábil (resina Wang) al cual se fijó Fmoc-Ser-(t-Bu) mediante esterificación catalizada con DMAP (4-dimetilaminopiridina). El grado de sustitución fue 0,57 mole/g. La síntesis se hizo en una escala de 0,27 mole usando un exceso 5 veces mayor de aminoácidos Fmo y reactivos de activación DCI (N,N'diisopropilcarbodiimida)/HOBt (1-hidroxibenzotriazol) en DMF. El tiempo de acoplamiento fue de aproximadamente 60 minutos con monitoreo espectrofotométrico de desprotección Fmoc.

Los cuatro tioles de cisteína se protegieron con grupos S-t-Butil y se usó un esquema de protección máxima para todas las demás cadenas secundarias : Ser(t-Bu), Thr(t-Bu), Tyr(t-Bu), Asp(O-t-bu), Glu(Ot-Bu), Lys(Boc), Trp(Boc), Asn(Trt), Gln(Trt) y Arg(Pmc). Luego de cada acoplamiento se taponó con anhídrido acético y DIEA en DMF.

La resina polipéptida que resultó se trató a temperatura ambiente con una mezcla fresca de TFA/agua/TIS (resina de triisopropilsilano)/fenol (78 :5 :12 :5, v/v/v/peso, 10 ml/g) durante 2,5 – 3,0 horas. El derivado polipéptido separado se precipitó por filtración directa de la mezcla de separación en metil-t-butiléter (MTBE) frío y el producto precipitado se separó mediante centrifugación, se lavó dos veces con éter y se secó al aire.

2

Luego, el producto crudo se disolvió en ácido acético diluido, se liofilizó y se redisolvió en ácido acético al 50% y se aplicó a una columna de Sephadex G-50 (70x25) usando ácido acético al 50% como la fase móvil. Las fracciones recogidas se analizaron mediante espectrometría de masa MALDI-TOF y las que contenían el derivado polipéptido deseado (MW 8,436,9 Da) se agruparon y liofilizaron luego de ser diluidas en agua.

Las fracciones agrupadas se disolvieron nuevamente en ácido acético al 50% y se purificaron más cargándolas en una columna semipreparativa Vydac C₄ de 250x10 mm. Se fluyeron las muestras a una tasa de flujo de 3 ml/min con un gradiente lineal de 20-80% B en 60 minutos, donde B era TFA al 0,1% en acetonitrilo y A, TFA al 0,1% en agua. La detección se hizo a 280 nm y antes del doblamiento, solo se agruparon y liofilizaron las fracciones que contenían el polipéptido objetivo.

El doblamiento del derivado de quimiocina purificado mediante RP-HPLC se hizo disolviendo primero 10 mg del producto en 1mg de 6M de GnHCl, 0,1 M Na₂HP₄ y 10 mM Tris a un pH de 8,0 y a temperatura ambiente. Luego de 20 minutos, se diluyó la solución agregando 10ml de agua a la concentración final de 0,6 M de GnHCl, 10 mM de Na₂HP₄, 1 mM de Tris, a un pH de 7,2 y una concentración de péptido de 1mg/ml. El doblamiento se inició agregando cisteína a una concentración de aproximadamente 20 mM (cerca de 100 veces el exceso molar con respecto a la concentración del péptido) y aumentando gradualmente la temperatura a 37°C.

La reacción de doblamiento que ocurrió a la temperatura constante de 37°C en aire se monitoreó mediante análisis RP-HPLC de 25 mL alícuotas de solución extinguida con ácido acético en un Módulo de Separación Waters 2690 equipado con un Detector de Arreglo de Fotodiodos Waters 996, usando una columna analítica Vydac₄ y un gradiente de acetonitrilo al 20-60%, en TFA al 0,1%/agua en 40 minutos con una tasa de flujo de 1,0 ml/min. Se recogió 1 microlitro de cada pico HPLC (correspondiente a los intermediatos de doblamiento de las reacciones de intercambio de tio-disulfuro), se mezcló con 1 microlitro de una solución saturada de ácido sinapínico en 1:2 de acetonitrilo/TFA al 1% en agua, se secó al vacío y se analizó mediante espectrometría de masa MALDI-TOF usando un espectrómetro Voyager-DE (Perseptive Biosystem, Framingham, MA) equipado con un láser de nitrógeno. Luego de 24 horas se formó el 78% del polipéptido doblado. El pico cuyo MW correspondió a ese producto doblado se analizó aún

más por reacción con N-etilmaleimida (NEM) para detectar la presencia de grupos de tiol libres (125 Da por cada SH).

La actividad biológica de hu-TARC que se obtuvo por la metodología de la presente invención, se hizo de acuerdo con el método Imai (T.Imay y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 271, 21514, 1996).

Se evaluaron las líneas de célula T humanas, Hut78, Hut 102 y Jurkat, así como monolitos, neutrófilos y linfocitos frescos para su migración a través de un filtro de policarbonato como respuesta a TARC. No se provocó ninguna respuesta quimiotáctica en los monocitos ni en los neutrófilos, ni por TARC preparado mediante síntesis química, ni por TARC recombinante. En las líneas de célula T, Hut78 y Hut102, el TARC sintético, así como el TARC recombinante indujo la migración con una curva típica acampanada con un efecto máximo a 100 ng/ml.

EJEMPLO 2

Síntesis y doblamiento de Cys^{10,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC y Cys^{11,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC

La síntesis, purificación y doblamiento de los derivados Cys^{10,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC y Cys^{11,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC se hizo en las mismas condiciones que se adoptaron para Cys^{10,11,34,50} (S-t-Bu)-hu-TARC (Ejemplo 1), siendo la única diferencia la protección Trt en Cys¹⁰ y en Cys¹¹, respectivamente, la cual fue removida en forma concomitante hasta la separación de los precursores del polipéptido de la resina. Los rendimientos de las quimiocinas dobladas finalmente fueron de 80% y 79%, respectivamente.

EJEMPLO 3

Síntesis y doblamiento de Cys^{34,50} (S-Bu)-hu-TARC

La síntesis, purificación y doblamiento del derivado Cys^{34,50}(S-Bu) hu-TARC se hizo en las mismas condiciones de los derivados de los Ejemplos 1 y 2, salvo que tanto Cys¹⁰ como Cys¹¹ se protegieron Trt, el cual fue removido durante la separación final de la resina mediante TFA. El rendimiento del producto doblado fue de aproximadamente 75%.

EJEMPLO 4

Síntesis y doblamiento de Cys^{10,11,26,34,50,66}(S-t-Bu)-hu-I-309.

La síntesis de hu-I-309 que contenía 6 cisteínas protegidas (S-t-Bu) se hizo en una escala de 0,12 mole en las mismas condiciones que el Ejemplo 1 usando una resina Wang Fmoc-Lys(Boc) (grado de sustitución de 0,61 mmol/g). La resina de polipéptido que resultó se trató según se describe en el Ejemplo 1 y el material purificado G50 se purificó aún más cargándolo en una columna Vydac C₁₈ de 250x10 mm (tal como se muestra en las Figuras 1 y 2).

El doblamiento del derivado de quimiocina purificado mediante RP-HPLC se hizo disolviendo 65 mg del producto en 60 ml de 0,6M de GuHCl, 10 mM de NaHPO₄ y 1 mM Tris a un pH de 8,0 y agregando cisteína a una concentración de 100 veces el exceso molar con respecto al péptido. La solución del polipéptido se dejó a 37°C durante 4 días. Luego de acidulación con TFA, el material doblado se aisló mediante RP-HPLC usando una columna Vydac C₁₈ de 250x10 mm (tal como se muestra en las Figuras 3 y 4). El apareamiento completo de cisteína se analizó mediante espectrometría de masa luego de reacción con N-etilmaleida (NEM). No se Observó aumento en MW que indicara la ausencia de grupos de tiol libre (tal como se muestra en la Figura 5). El rendimiento de la quimiocina final doblada fue casi de 25%. El Hu-I-309 sintético, doblado, demostró una actividad biológica equivalente a proteína recombinante (Figura 6).

Se hizo cromatografía analítica bajo las siguientes condiciones:

Columna: C18 250 x 4,6 mm (Vydac#238TP54)

Fase Móvil: A = 100% H₂O TFA 0,1%

B = 100% CH₃CN TFA 0,1%

Gradiente: el cromatograma reportó composición B%

Detector: 214 nm

EJEMPLO 5

Síntesis y doblamiento de fragmento de Plasmodio vivax terminal C.

La síntesis y purificación de la proteína cirumsporozoita Plasmodium vivax (PvCS) 303-372 que contenía 4 cisteínas protegidas (S-t-Bu) se hizo en las mismas condiciones que el Ejemplo 1.

El doblamiento se hizo agregando 27 mg de péptido en 2,7 ml de 6 M de GuHCl en 0,1 M de amortiguador Tris, a un pH de 8,5. La solución se mezcló durante 10 minutos. Luego se agregaron 13,5 ml de 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl amortiguada a un pH de 8,8 en 0,2 M de amortiguador Tris. Finalmente se agregaron 10,8 ml de 35 mM de cisteína en 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl amortiguado a un pH de 8,8 en 0,2 M de amortiguador Tris. La mezcla de la reacción se llevó a 37°C. La reacción de doblamiento siguió en HPLC de fase inversa hasta la terminación (3 a 6 horas). (Figura 7 A) y se detuvo la reacción enfriando durante 5 minutos a 4°C seguidos por la adición de TFA al 1% (3 ml de TFA al 10%). Posteriormente, el producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (Figura 8) y se determinó la masa del producto final (Figura 9). El rendimiento del producto final oxidado fue de 70 a 80%.

Se hizo cromatografía analítica bajo las siguientes condiciones:

Columna: C4 250 x 4,6 mm (Vydac#214TP54)

Fase Móvil: A = 100% H₂O TFA 0,1%

B = 100% CH₃CN TFA 0,1%

Gradiente: el cromatograma reportó composición B%

Detector: 214 nm

EJEMPLO 6

Síntesis y doblamiento a grande escala del fragmento Plasmodium falciparum de terminal C

Se hizo una síntesis y purificación a grande escala de la proteína circunsporozoita Plasmodium falciparum (PfCS 282-383) que contenía solo 2 cisteínas protegidas (S-t-Bu) de 4, en las mismas condiciones que el Ejemplo 1 (tal como se muestra en las Figuras 10 y 11) salvo por lo siguiente:

El doblamiento se hizo disolviendo 1,1 g de péptido parcialmente purificado en 1,0 L de 0,1 M CH₃COONH₄, a un pH de 8,0, sin agregar cisteína libre al amortiguador de doblamiento. La mezcla de la reacción se mantuvo a 32°C durante 18 horas. Luego, el producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (Figuras 12 y 13). El rendimiento del producto final oxidado fue de casi 37%.

Se hizo cromatografía analítica bajo las siguientes condiciones:

Columna: C18 250 x 4,6 mm (Vydac#238TP54)

Fase Móvil: A = 100% H₂O TFA 0,1%

B = 100% CH₃CN TFA 0,1%

Gradiente: el cromatograma reportó composición B%

Detector: 214 nm

22

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para doblar polipéptidos sintetizados químicamente, que comprende tratar un polipéptido y/o una proteína que comprende dos o más residuos derivados de cisteína con un agente reductor en un amortiguador de doblamiento que tenga un pH y una temperatura predeterminados.

2. El proceso según la reivindicación 1, en el cual el residuo derivado de cisteína corresponde al residuo de cisteína S-butil-tio.

3. El proceso según la reivindicación 1 ó 2, en el cual el agente reductor es cisteína.

4. El proceso según la reivindicación 1, 2 o 3, en el cual el amortiguador de doblamiento comprende una o más sales caotrópicas.

5. El proceso según la reivindicación 4, en el cual las sales caotrópicas son escogidas del grupo compuesto por cloruro de guanidinio y úrea.

6. El proceso según la reivindicación 4 ó 5, en el cual las sales caotrópicas en el amortiguador de doblamiento están presentes en una concentración de 0,1, a 1 M.

7. El proceso según la reivindicación en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el amortiguador de doblamiento tiene un pH alcalino.

8. El proceso según la reivindicación 7, en el cual el pH está entre 7 y 9.

9. El proceso según la reivindicación 7 u 8, en el cual el pH está entre 7 y 8,5.

10. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la temperatura del amortiguador de doblamiento está entre 25° y 40°C.

11. El proceso según la reivindicación 10, en el cual la temperatura está entre 27°C y 38°C.

12. El proceso según la reivindicación 10 u 11, en el cual la temperatura es de aproximadamente 37°C.

21

13. Un proceso para la preparación de proteínas biológicamente activas, que comprende:

(a) sintetizar químicamente un polipéptido que comprenda dos o más residuos derivados de cisteína;

(b) tratar dicho polipéptido con un agente reductor en un amortiguador de doblamiento que tenga un pH y una temperatura predeterminados; y

(c) purificar las proteínas dobladas obtenidas.

14. El proceso según la reivindicación 13, en el cual el residuo derivado de cisteína corresponde a un residuo S-butil-tio-cisteína.

15. El proceso según la reivindicación 13 o 14, en el cual el agente reductor es cisteína.

16. El proceso según la reivindicación 13, 14 o 15, en el cual el amortiguador de doblamiento comprende una o más sales caotrópicas.

17. El proceso según la reivindicación 16, en el cual las sales caotrópicas se escogen del grupo compuesto por cloruro de guanidinio y úrea.

18. El proceso según la reivindicación 15 o 16, en el cual las sales caotrópicas en el amortiguador de doblamiento están presentes a una concentración de 0,1 - 1 M.

19. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el cual el amortiguador de doblamiento tiene un pH alcalino.

20. El proceso según la reivindicación 19, en el cual el pH del amortiguador de doblamiento está entre 7 y 9.

21. El proceso según la reivindicación 20, en el cual el pH está entre 7 y 8,5

22. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en el cual la temperatura del amortiguador de doblamiento está entre 25°C y 40°C.

23. El proceso según la reivindicación 22, en el cual la temperatura está entre 27°C y 38°C.

24. El proceso según la reivindicación 22 o 23, en el cual la temperatura es de aproximadamente 37°C.

25. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, que comprende los pasos de:

(a) ensamblar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tio en un soporte polimérico insoluble mediante elongación de cadena por pasos;

(b) separar dicha cadena de polipéptido de cisteína S-t-butil-tio de dicho soporte mediante acidólisis;

(c) purificar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tio obtenido;

(d) doblar el polipéptido de cisteína S-t-butil-tiol purificado tratando dichos polipéptidos con un exceso molar de cisteína en un amortiguador de doblamiento que comprende una sal caotrópica, preferiblemente cloruro de guanidinio, y con un pH alcalino y una temperatura entre 37°C y

(e) purificar las proteínas dobladas obtenidas por mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) de fase inversa.

26. El proceso según la reivindicación 25, en el cual la sal caotrópica es cloruro de guanidinio.

27. El proceso según la reivindicación 25 o 26, en el cual dicho soporte polimérico es una poliamida o una resina basada en poliestireno funcionalizada con el de ácido hidroximetilfenoxiacético lábil.

25

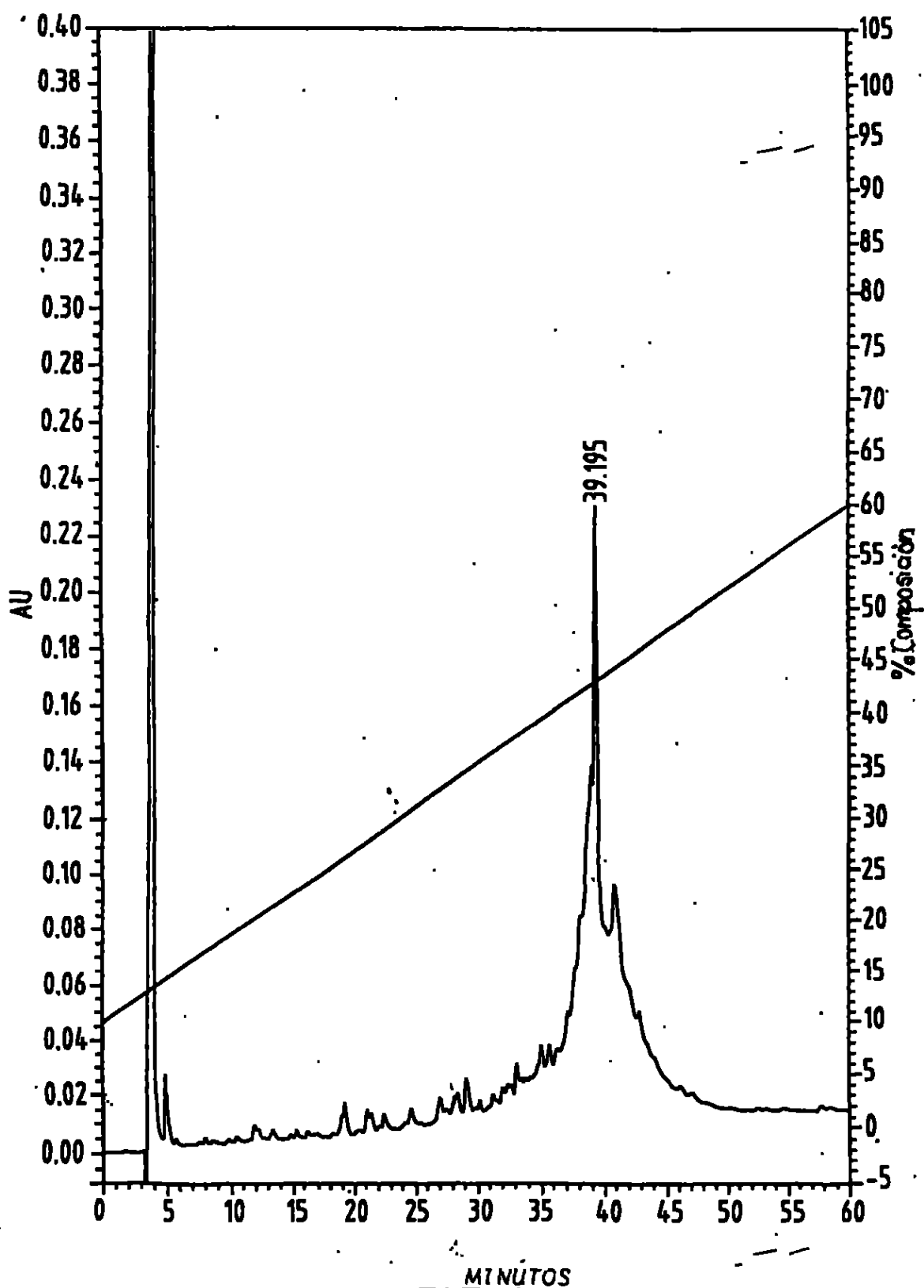
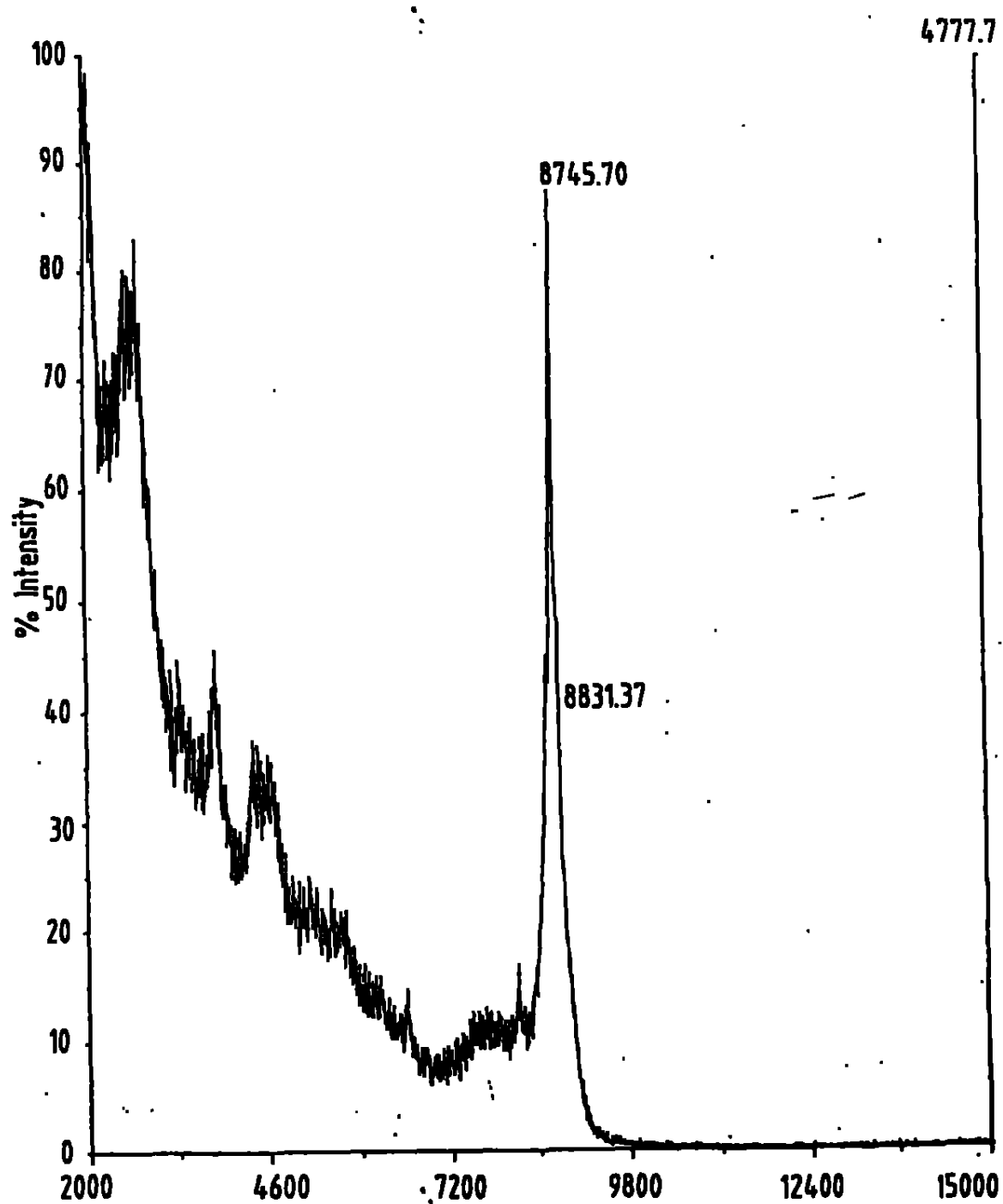


FIG. 1

26

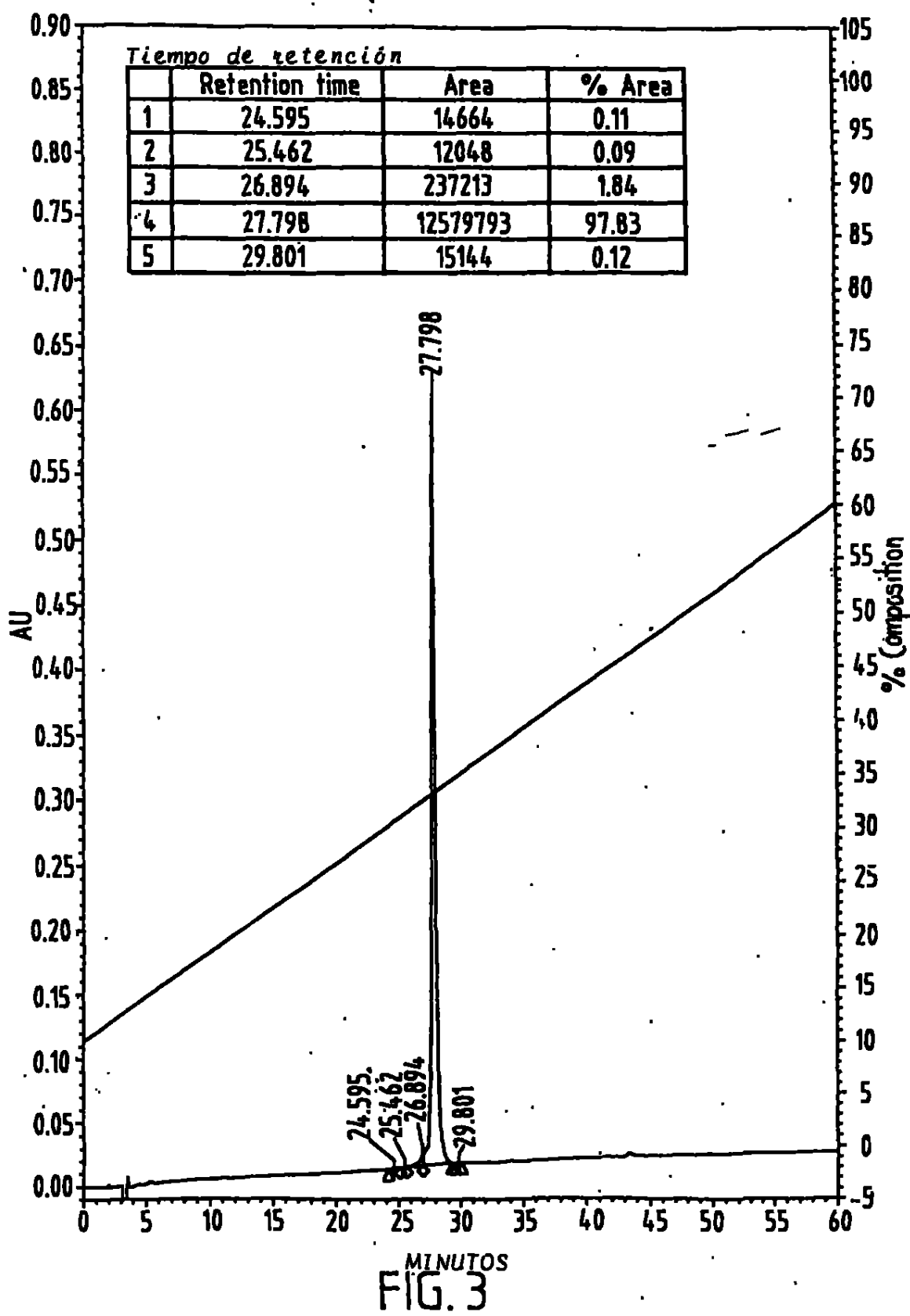
2/13



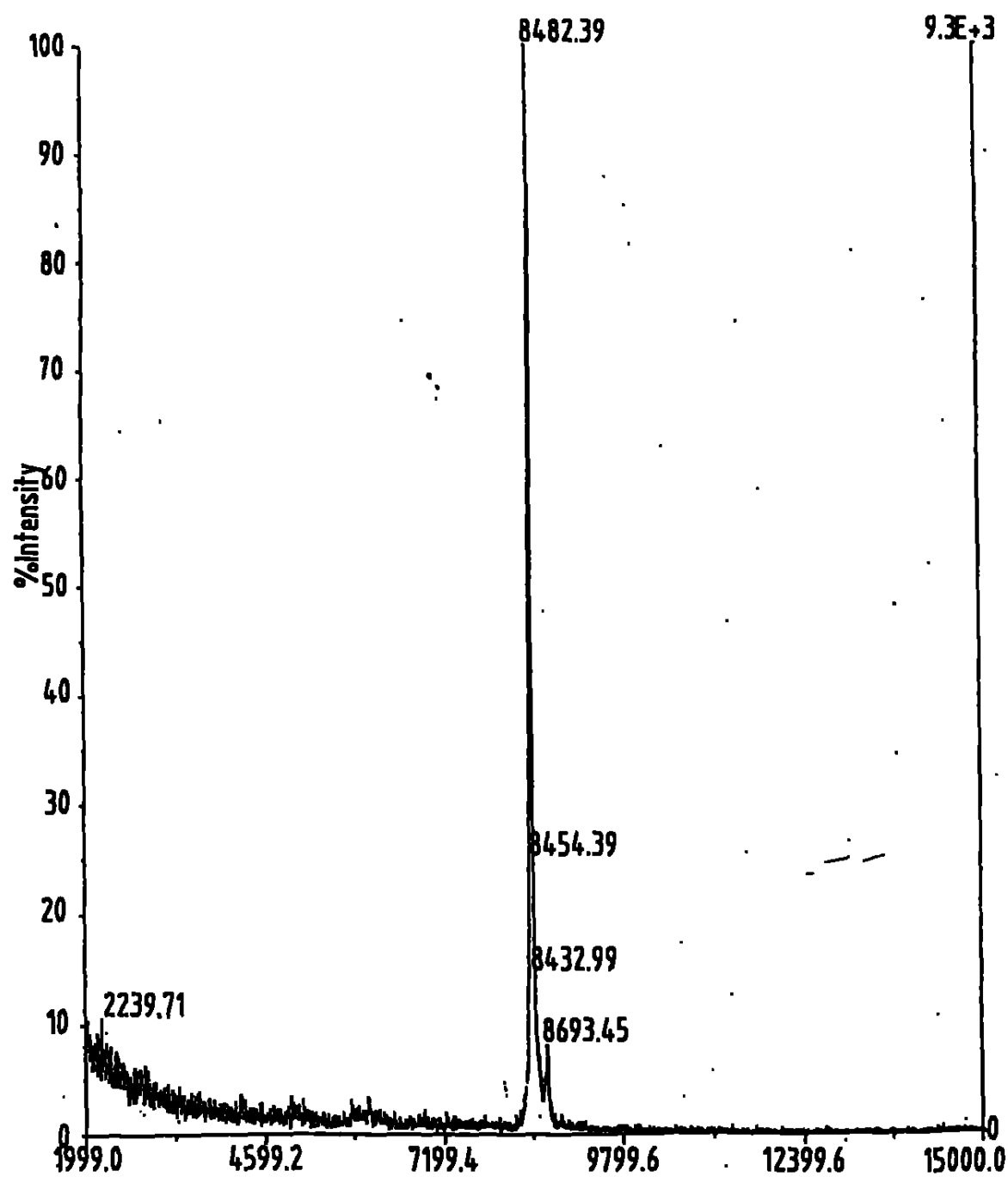
MASA
FIG. 2

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

22



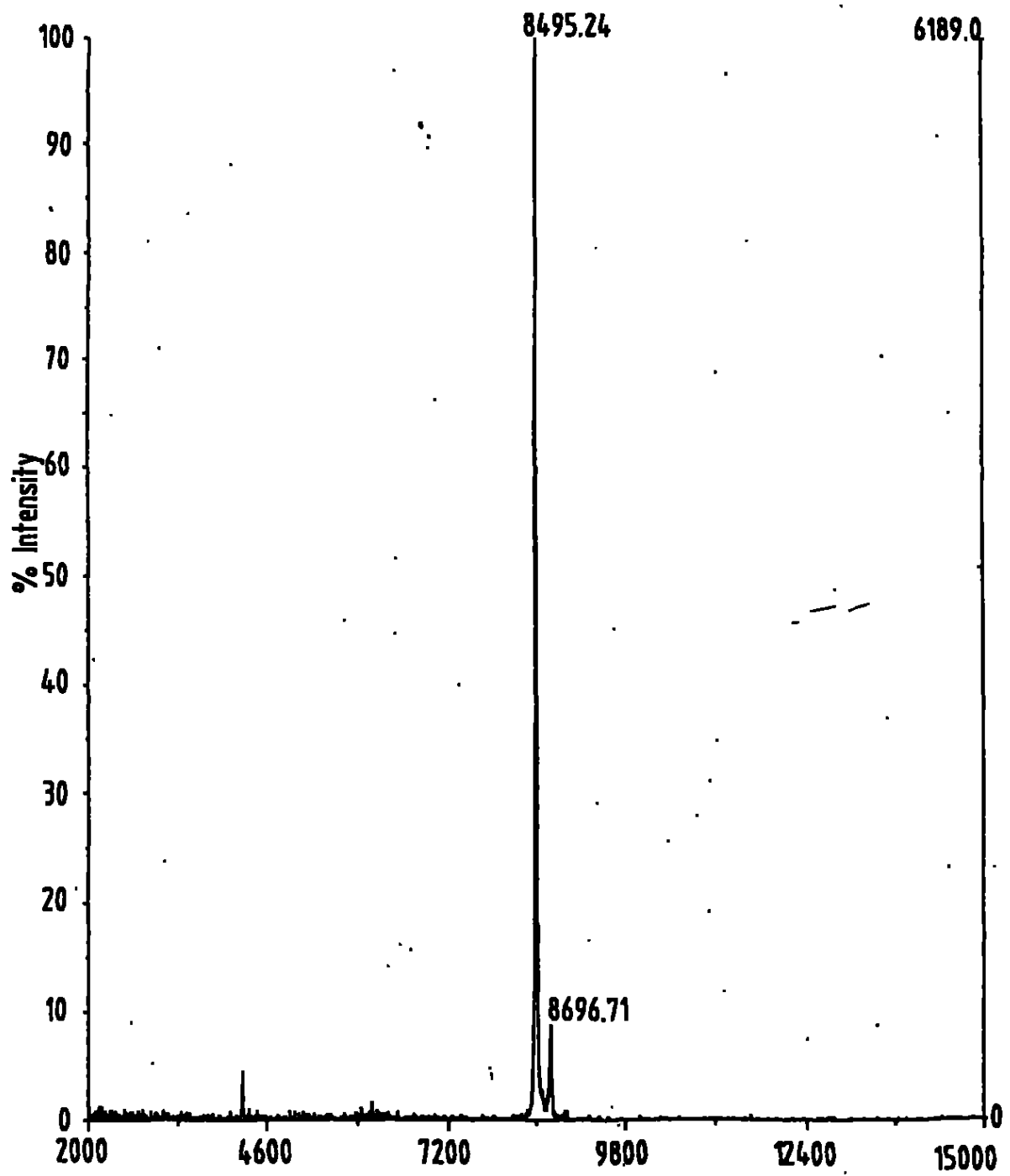
4/13



MASA
FIG. 4

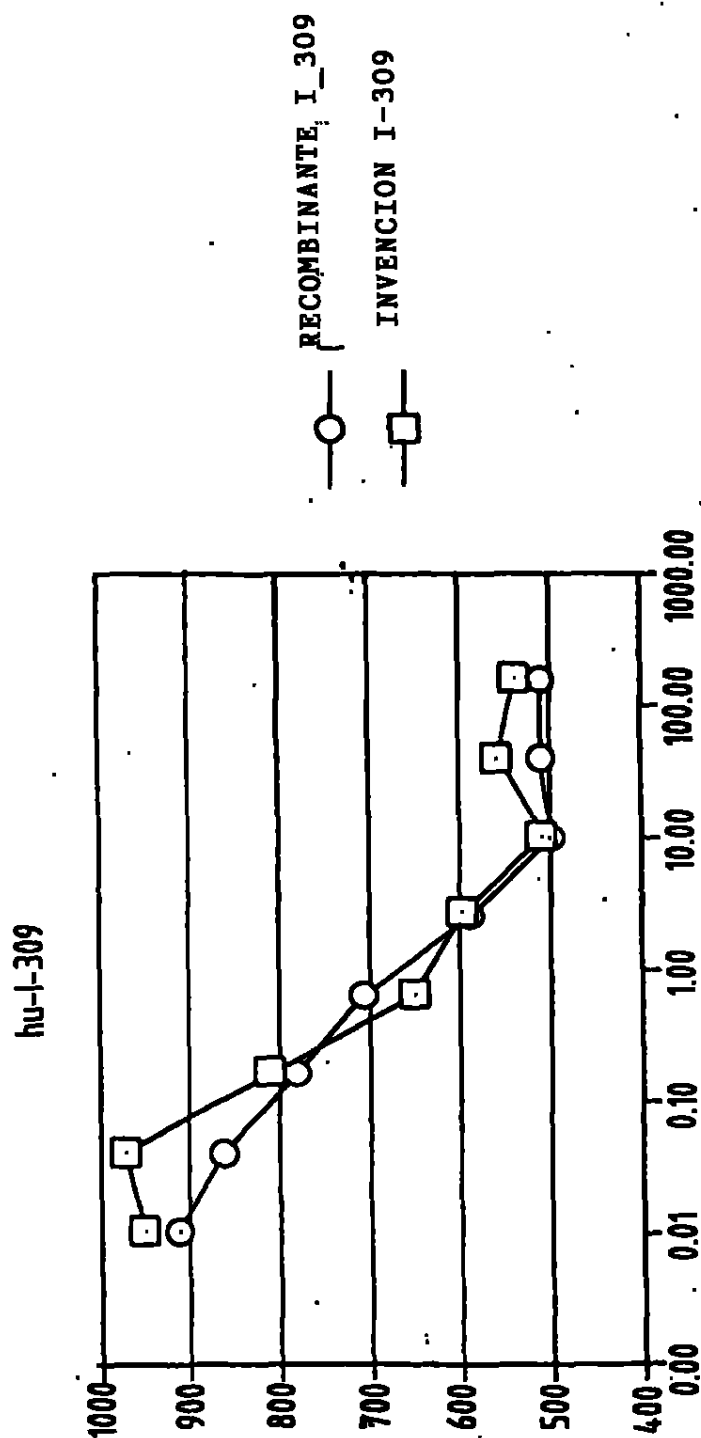
29

5/13



MASA

FIG. 5



Quimiocina

FIG. 6

31

7/13

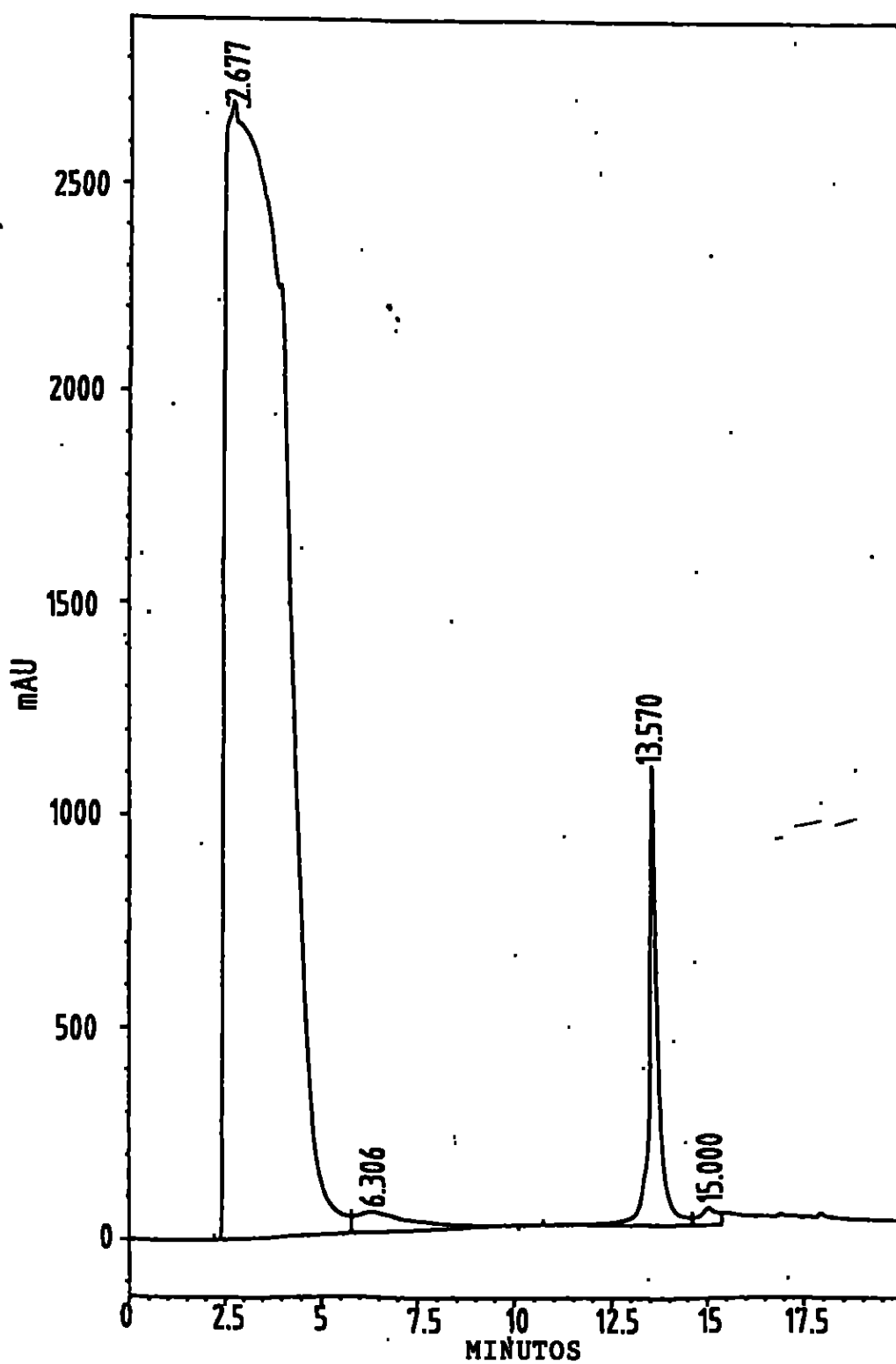
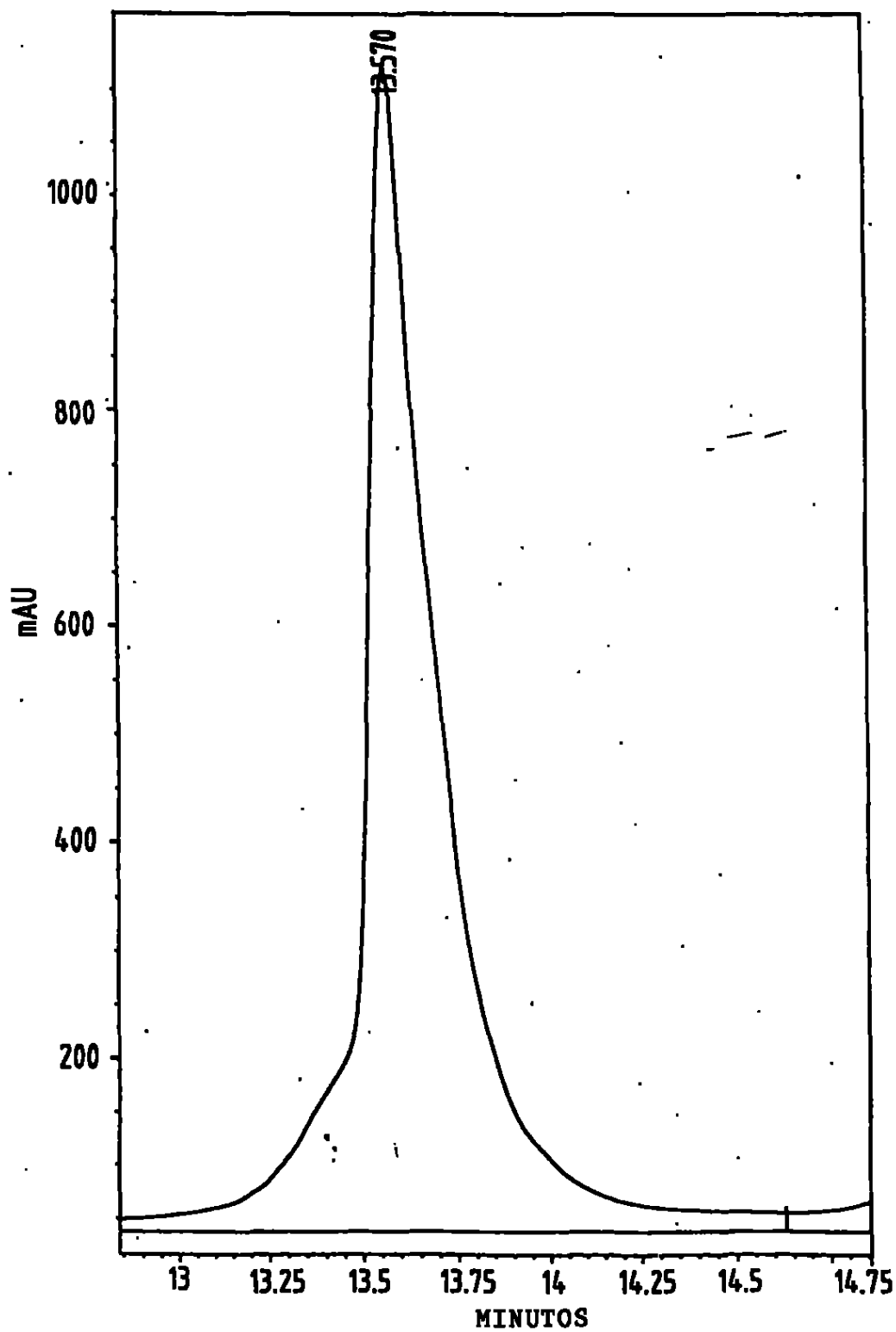


FIG. 7

8/13

FIG. 8

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

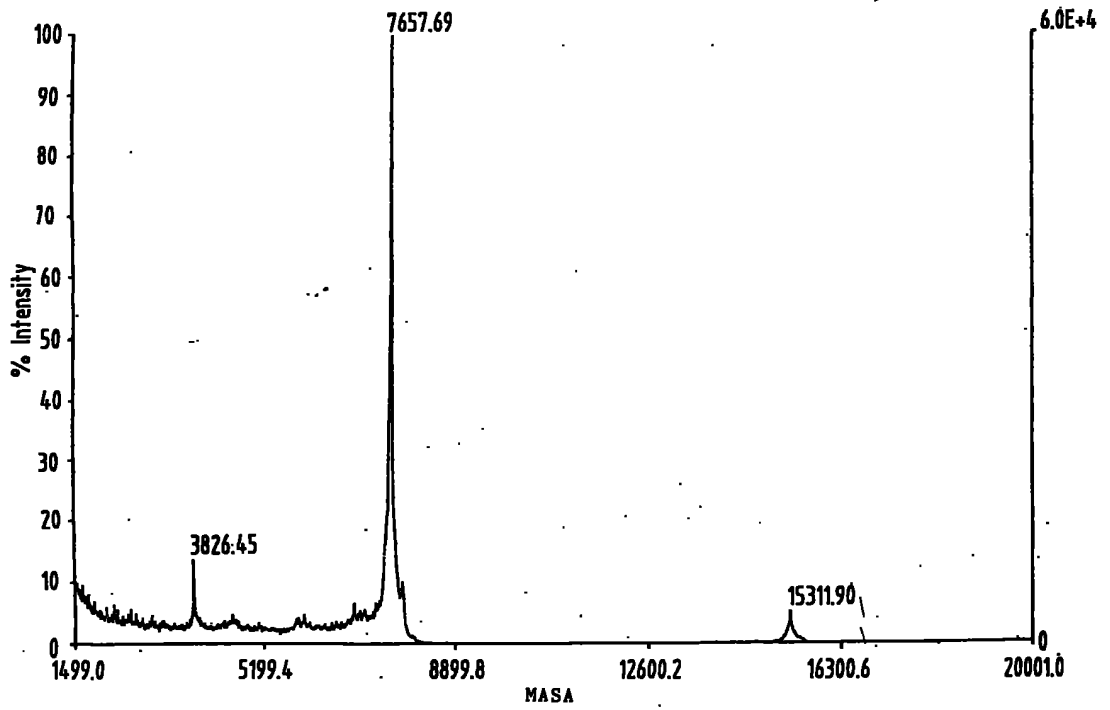


FIG. 9

WFO 02/50099

9/13 ..

PCT/EP01/4163

27

10/13 ..

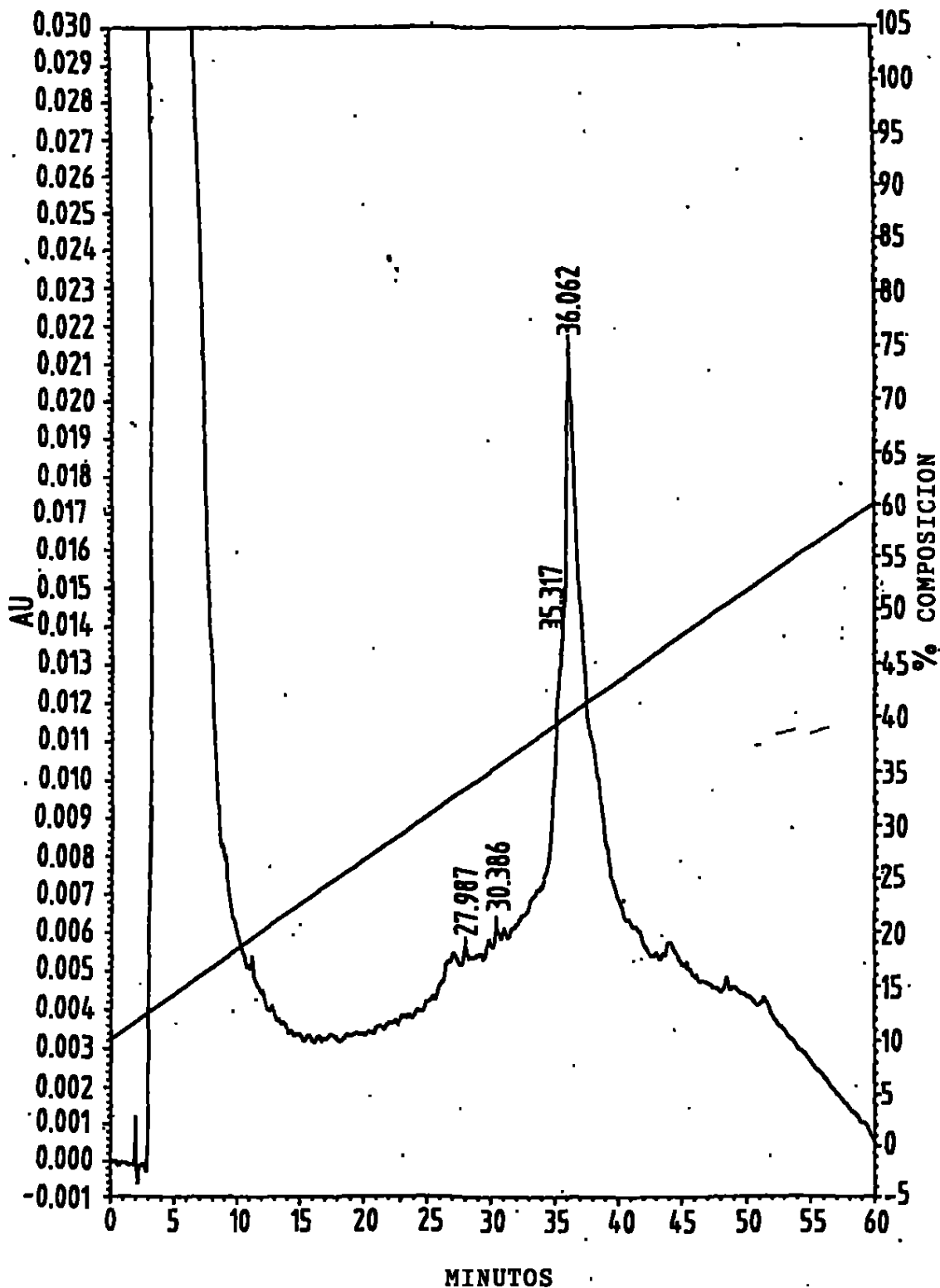
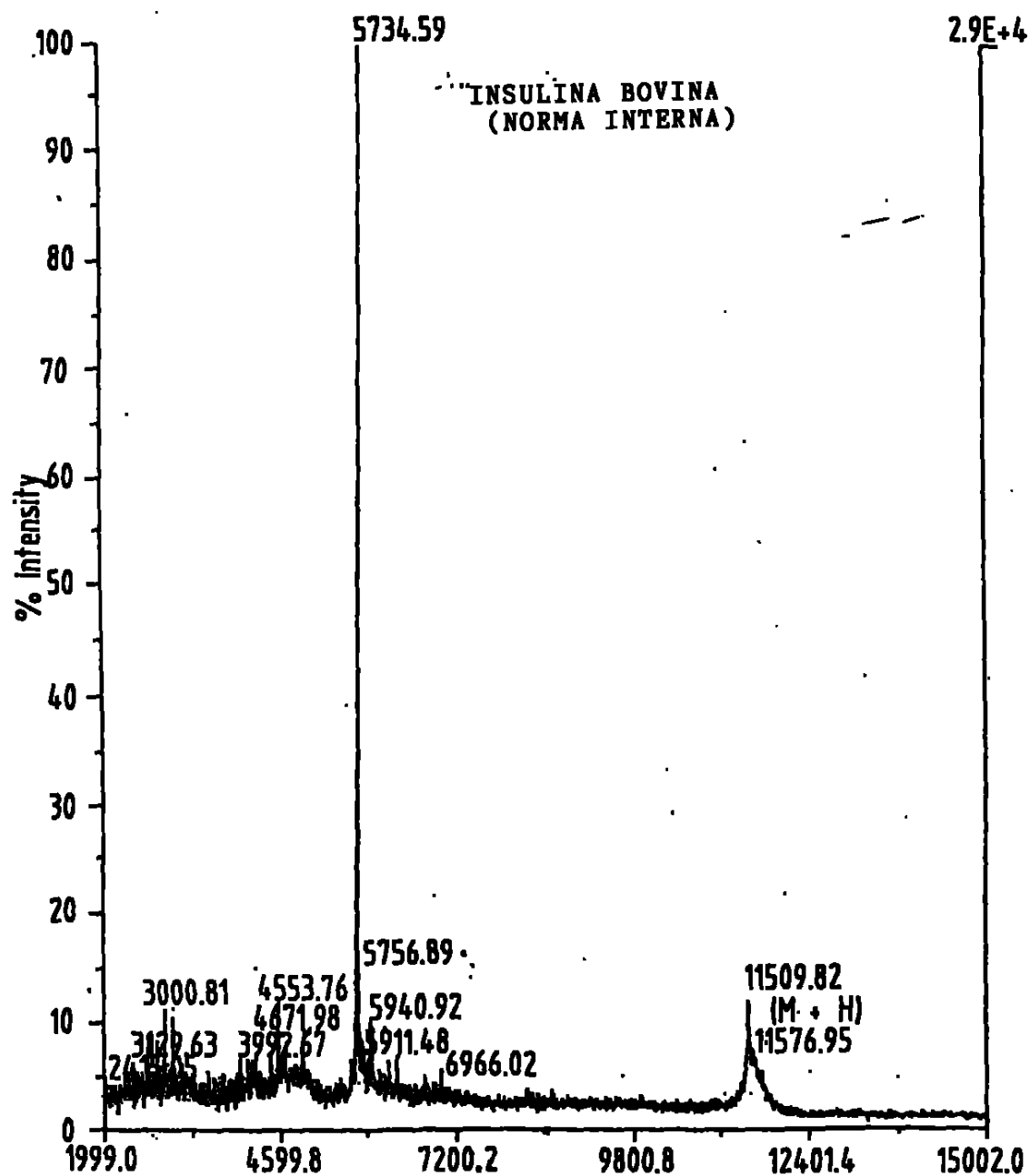


FIG. 10

11/13

MASA
FIG. 11

46

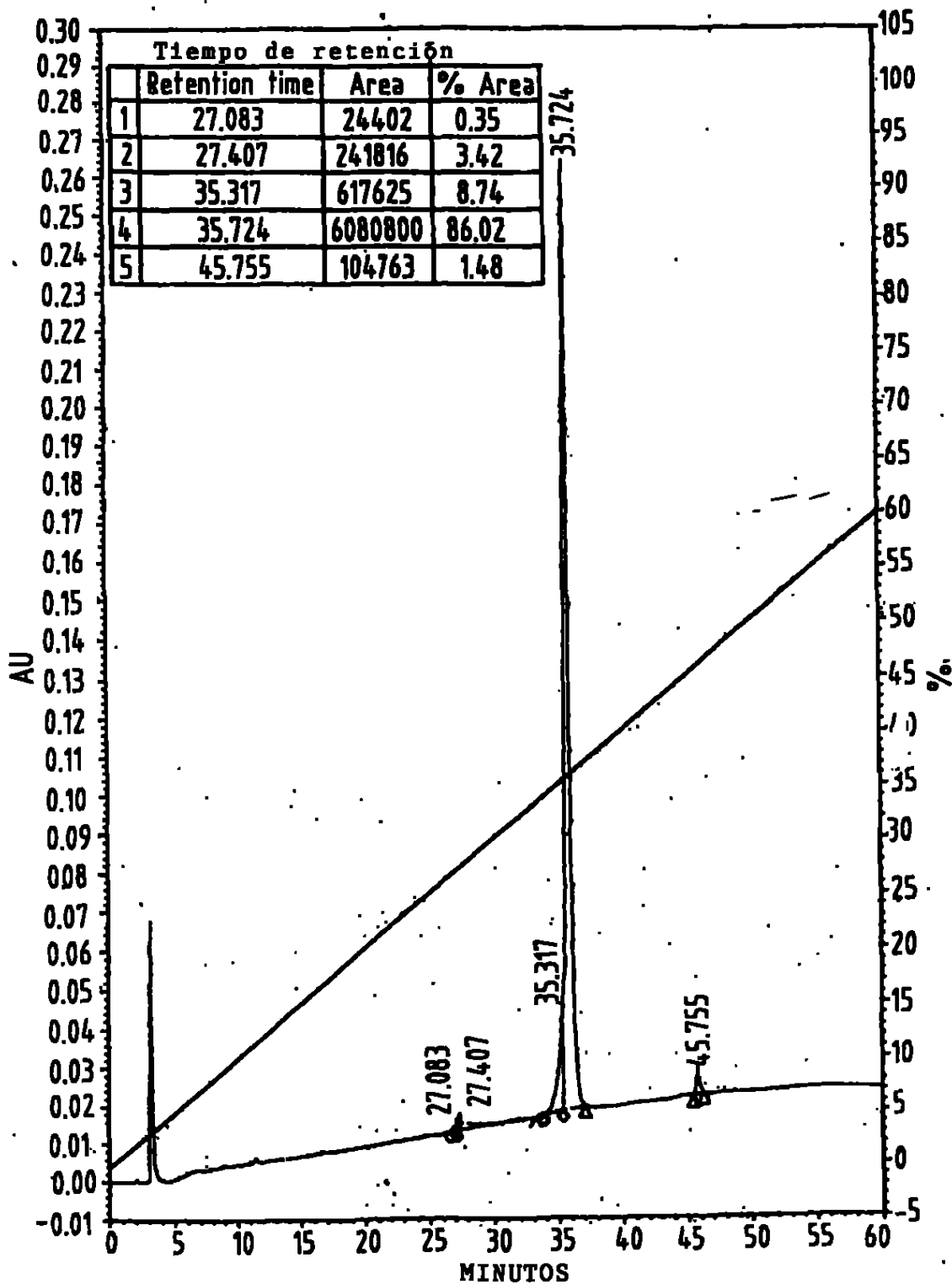
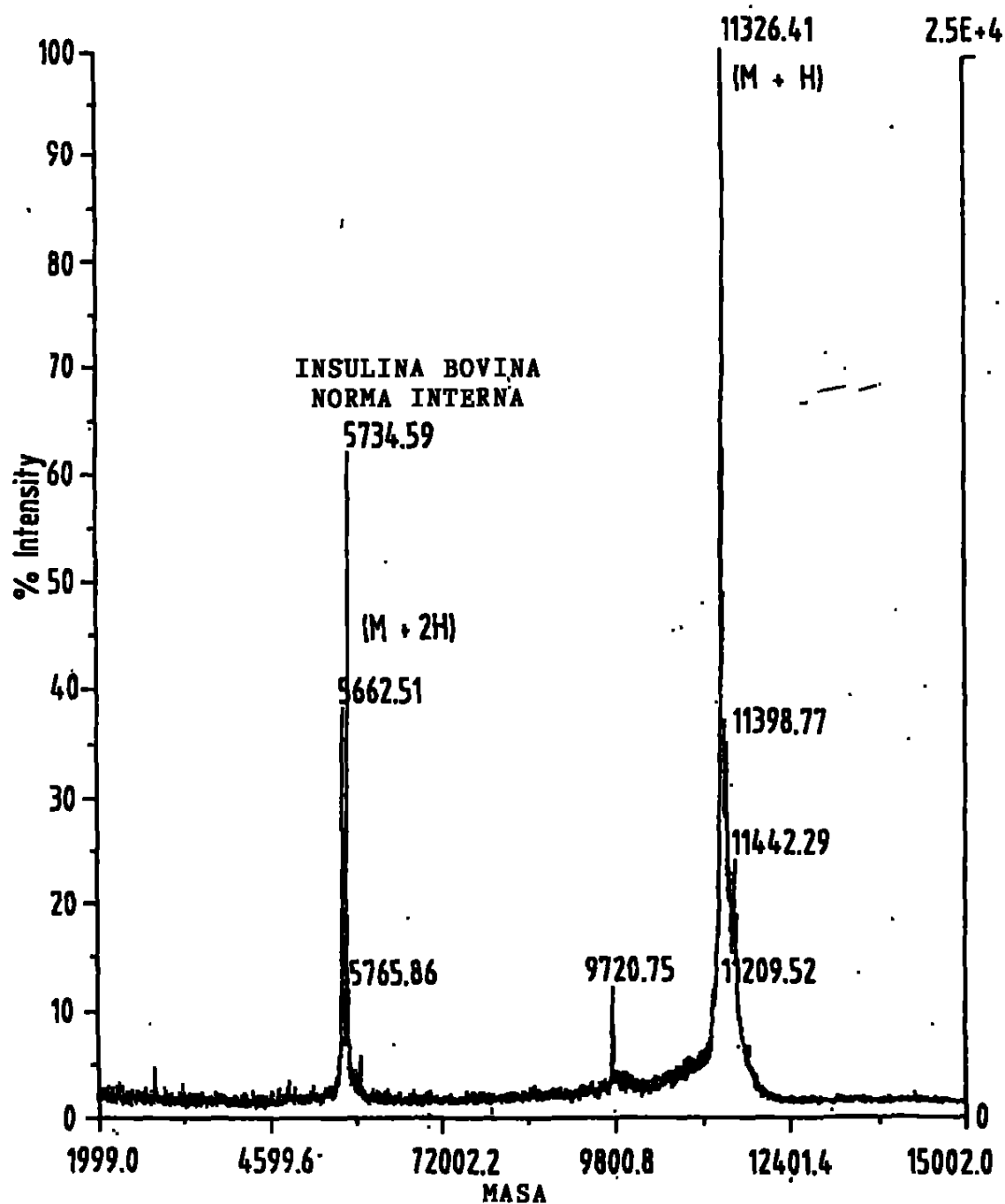


FIG. 12

13/13

FIG. 13

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference L/DV09/VA/10	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP 01/ 14163	International filing date (day/month/year) 27/11/2001	Priority date (day/month/year) 27/11/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K1/113		
Applicant RMF DICTAGENE S.A., et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08/05/2002	Date of completion of this report 27/09/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Netherlands Tel.: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer BRENNAN J Tel. (+49-89) 2399 2828

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)



9

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in the claims meets the criteria mentioned in Article 33 (1) PCT, i.e. it appears to be novel, to involve an inventive step and to be industrially applicable.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 June 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/50099 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C07K 1/113

(21) International Application Number: PCT/EP01/14163 ✓

(23) International Filing Date:
27 November 2001 (27.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00204207.5 27 November 2000 (27.11.2000) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): RMT
DICTAGENE S.A. [CH/CH]; Crochetes 22, CH-1066
Epalinges (CH).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): VERDINI, Anto-
nio [IT/IT]; Viale G. Marconi, 29, I-47011 Castrocaro
Terme (IT). CORRADIN, Gianpietro [CH/CH]; Ch.
Fraz-Dom-Nicod 12, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lau-
sanne 26 (CH). ROGGERO, Mario [CH/CH]; Pl. de la
Croix-Blanche 25, CH-1066 Epalinges (CH).
- (74) Agents: VAN SOMEREN, Petronella, Franchen et al.;
Arnold & Siedema, Sweelinckplein 1, NL-2517 GK The
Hague (NL).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, ~~CQ~~ CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CR, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/50099 A2

(54) Title: PROCESS FOR FOLDING CHEMICALLY SYNTHESIZED POLYPEPTIDES

(57) Abstract: The present invention relates to a process for folding chemically synthesized polypeptides, comprising treating a polypeptide and/or protein that comprises two or more derivatized cysteine residues with a reducing agent in a folding buffer having a predetermined pH and temperature, wherein the derivatized cysteine residue corresponds to S-butyl-thio-cysteine residue and wherein the reducing agent is cysteine.



2020
Bogotá, D.C.,

41

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctor:
Luis Felipe Castillo
Apoderado
RMF Dictagene S.A.

Oficio N°

09513

ASUNTO:	Radicación N°	03-029685
	Solicitud Internacional	PCT/EP2001/14163
	Fecha Inicio fase nacional	27/06/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

31 OCT. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.