

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 781**

51 Int. Cl.:

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05789512 .0**

96 Fecha de presentación: **26.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1794294**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **CARBOXIPEPTIDASA B RECOMBINANTE.**

30 Prioridad:
27.09.2004 EP 04104696

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
INDUSTRIEPARK HÖCHST, GEB. K 801
65926 FRANKFURT AM MAIN, DE**

72 Inventor/es:
**VAN DEN HEUVEL, Joop;
BARTUCH, Jörg y
CORDES, Arno**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 781 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

Carboxipeptidasa B recombinante

La presente invención se refiere a la procarboxipeptidasa B y a la carboxipeptidasa B, así como a procedimientos para su preparación.

5 La carboxipeptidasa B (CPB) es una exopeptidasa que se escinde mediante la hidrólisis de uniones peptídicas para dar aminoácidos básicos como lisina, arginina y ornitina. La escisión se produce en el extremo C-terminal de los polipéptidos. Se trata de una peptidasa que contiene zinc (EC 3.4.17.2).

10 La carboxipeptidasa B se forma a partir de una preprocarboxipeptidasa B sin actividad enzimática. De la preprocarboxipeptidasa B se obtiene por escisión de un péptido señal para obtener una procarboxipeptidasa B que tampoco presenta actividad enzimática. De esta luego se separa otro péptido para obtener la carboxipeptidasa activa.

El peso molecular de la carboxipeptidasa B es de aprox. 35 kD. Se la utiliza para una multiplicidad de fines, en especial para la preparación de péptidos como por ejemplo la insulina y en el análisis de secuencias de proteínas. La carboxipeptidasa B por lo general se procesa a partir del páncreas porcino.

15 Las secuencias de ADNc de la carboxipeptidasa B humana son de conocimiento general.

En el documento WO 96/23064 se describe un procedimiento para la preparación de carboxipeptidasa B recombinante de rata. Los ensayos para lograr la expresión del plásmido que se describe allí, no tuvieron el éxito deseado.

20 La carboxipeptidasa comercializada en el mercado (purificada a partir de fuentes naturales) por lo general presenta actividades de aproximadamente 50 a 170 U/mg. 1 U equivale a hidrólisis de 1 mmol de hipuril-L-Arg/min a una temperatura de 25°C y un valor de pH de 7,65.

La carboxipeptidasa B siempre presenta impurezas constituidas por pequeñas cantidades de otras proteasas. Por lo tanto aún existe la necesidad de disponer de carboxipeptidasas de alta pureza con una actividad específica lo más elevada posible.

25 El objetivo se cumple poniendo a disposición de una nueva procarboxipeptidasa B (Pro-CPB) y una nueva carboxipeptidasa B (CPB) de acuerdo con las reivindicaciones. Las carboxipeptidasas de acuerdo con la invención presentan una actividad enzimática de al menos 200 U por mg, preferentemente más de 250 U por mg, más preferentemente de más de 270 U por mg.

30 Las carboxipeptidasas B de acuerdo con la invención pueden purificarse mejor. La carboxipeptidasa B obtenida del páncreas de porcinos posee en la HPLC de fase reversa una pureza de 81,6%, mientras que la CPB de acuerdo con la invención presenta una pureza de 97,4%. En la cromatografía de permeación de geles las carboxipeptidasas de acuerdo con la invención presentan una pureza de 99,1% respecto de una carboxipeptidasa purificada obtenida de páncreas de porcinos con una pureza de 77,2%. Mediante la estructura modificada sorpresivamente se logra una mayor estabilidad térmica a 40°C. Además existe una mayor estabilidad a largo plazo durante el almacenamiento en forma líquida a un valor de pH 8.

35 Por lo tanto, por una parte un objeto de la invención es un ácido nucleico, que codifica procarboxipeptidasa B (Pro-CPB) que comprende tres segmentos A, B y C, donde el segmento A presenta la secuencia de acuerdo con la Sec. ID. N° 1, el segmento B presenta la secuencia de la Sec. ID N° 2 y el segmento C presenta la secuencia de acuerdo con la Sec. ID N° 3.

40 Las secuencias de preferencia especial para el ácido nucleico que codifica para la procarboxipeptidasa B son

- Sec. ID N° 1 - Sec. ID N° 2 - Sec. ID N° 3

45 Además es un objeto de la invención la procarboxipeptidasa que puede obtenerse mediante la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención así como una carboxipeptidasa B que puede obtenerse por escisión de la procarboxipeptidasas B de la invención. Una escisión tal puede realizarse por ejemplo con tripsina.

Otro objeto de la invención es un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la invención así como un organismo transformado que contiene el vector de expresión según la invención.

50 Otro objeto de la invención es una proteína que contiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Sec. ID N° 8 con al menos 5 mutaciones seleccionadas del grupo D22H, S24N, E25I, R33T, A63T, E69K, C94V, E115Q, K120E, D135E, D137R, N138T, Q168P, D177E, Y184R, A186I, F191L, N194K, N240D, T245S, V246I, V250R, N254D, I295M, D309N, S314A, G318A, A319T, Y327H, S330K, S337A, N353D, F370Y, A381P, Q384E, V390I, N395S, T397V.

En una forma de realización se añadió una Y como aminoácido 402.

En una realización preferida la proteína de acuerdo con la invención presenta al menos siete, más preferentemente como mínimo diez y sobre todo preferentemente como mínimo quince de las mutaciones antes indicadas.

5 La proteína de acuerdo con la invención es una proteína recombinante libre de impurezas de otras proteasas naturales. Además se la puede producir con un grado de pureza especialmente alto, en especial con una pureza mayor que 170 U por mg, más preferentemente mayor que 200 U por mg, más preferentemente aún mayor que 250 U por mg y sobre todo preferentemente mayor que 280 por mg.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la expresión de pro-CPB que comprende los pasos:

- fermentación de un organismo transformado,
- 10 - inducción de la expresión,
- purificación de la pro-CPB

así como un procedimiento para la expresión de la carboxipeptidasa B que comprende los pasos de:

- fermentación de un organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 10,
- inducción de la expresión,
- 15 - activación mediante la escisión de la pro-CPB para dar CPB,
- purificación de la CPB.

Otro objeto de la invención es una carboxipeptidasa con la secuencia de acuerdo con la Sec. ID N° 7.

Una mutación significa una sustitución de un aminoácido por otro, una inserción que es la introducción adicional de otro aminoácido y una delección que es la eliminación de un aminoácido.

20 Un sistema de expresión especialmente preferido es *Pichia pastoris*. Pero en principio también pueden introducirse otros sistemas de expresión usuales como el sistema de baculovirus en células de insectos o una expresión en células de mamíferos. El uso del sistema de expresión *Pichia* se describe por ejemplo en la patente estadounidense US 5.102.789 a la que se hace referencia aquí.

25 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis química en fragmentos para después ligar los fragmentos. Las proteínas de acuerdo con la invención pueden obtenerse posteriormente mediante la expresión de los correspondientes ácidos nucleicos. El ácido nucleico también puede obtenerse mediante mutagénesis dirigida específica de sitio, a partir de la secuencia de ADNc conocida de la CBP. Las formas de proceder se describen por ejemplo en *The Journal of Biological Chemistry*, 174 (1999), 19925 - 19933 al que se hace referencia en la presente.

30 La invención se explica en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos enunciados a continuación.

Los genes se clonaron en los siguientes vectores:

Pichia pastoris: pKINTEX, pKEXTEX, pPic α

E. coli: Tuner(DE3)pET22-OMPA

Arxula adeninovorans: pAL-ALEU2m-GAA 1.

35 Los mayores índices de expresión se obtuvieron en *Pichia pastoris* pKEXTEX-nproCPB.

Procesos de fermentación

Se desarrolló un procedimiento fed-batch así como un proceso continuo. Allí se produjo la secreción de aproximadamente 200 mg/l de nproCPB al medio.

Fermentación fed-batch

40 Medio de fermentación (para 1 litro):

Medio de hexafosfato

25 g de hexametáfosfato de sodio

9 g de sulfato de amonio

Medio de glicerina y sales

45,6 g de glicerina (86% en peso)

18,2 g de sulfato de potasio

14,9 g de sulfato de magnesio heptahidratado

5 0,9 g de sulfato de calcio dihidratado

PTM1 (oligoelementos) 1 ml/l

Alimentación de glicerina (1l)		
314 g de glicerina (86% en peso)	en 1000 ml de agua destilada	pasar por autoclave
		después de enfriar añadir 9 ml de PTM1 estéril
Alimentación de metanol (1l)		adición de 12 ml de PTM1 estéril
1 l de metanol		

Condiciones de fermentación

Temperatura	28°C	
Revoluciones de agitación	500 a 1000 rpm	
Tiempo de fermentación	90,1 a 138,6 h	
Gaseado	0,8 a 2 vvm	aire
Volumen inicial de la solución de cultivo	2 a 8 l	medio y cultivo inoculado
Volumen de inoculación	10% del volumen inicial total	cultivo con agitación
Presión parcial de oxígeno	6 a 100%	
Valor de pH	4,4 a 7,3	

10 Desarrollo de la fermentación

Alimentación de glicerina	Inicio:	con densidad óptica DO_{600} de la solución de cultivo (extinción 600 nm)
	Velocidad de adición	entre 0,4 y 1,8 ml/min de alimentación de glicerina
	Cantidad de adición:	entre 4,2 y 16,6% en relación con el volumen inicial
Alimentación de metanol	Inicio:	con DO_{600} entre 50 y 195
	Velocidad de adición:	entre 0,04 y 0,2 ml/min con control de contenido de metanol entre 0,1 y 3% de metanol en la solución de cultivo
Fin de la fermentación	DO_{600}	entre 144,2 y 510

Fermentación continua

Componentes del medio de Alimentación continuo (1 l)

9,8 ml de ácido fosfórico (75%)		
0,2 g de cloruro de calcio dihidratado		

ES 2 369 781 T3

6 g de sulfato de potasio		
2,28 g de sulfato de magnesio heptahidratado		
1,35 g de hidróxido de potasio	en 500 ml de agua destilada	
1 ml de Struktol SB2122		pasar por autoclave
5,4 mg de biotina en solución		esterilización por filtración
2,7 ml de PTM1		esterilización por filtración
6 ml de amoníaco (25%)		
239 ml de metanol		
	en 1000 ml con agua destilada pasada por autoclave	

Desarrollo de la fermentación

Alimentación de glicerina	Inicio:	con DO ₆₀₀ 16,5
	Velocidad de adición	entre 1,4 ml/min de alimentación de glicerina
	Cantidad de adición:	21,8% en relación con el volumen inicial
Alimentación de metanol	Inicio:	con DO ₆₀₀ 126,8
	Velocidad de adición:	0,23 ml/min
	Cantidad de adición:	9% en relación con el volumen inicial
Alimentación continuo	Inicio:	con DO ₆₀₀ 130,1
	Velocidad de adición:	entre 20 y 200 ml/h

Procedimiento de procesamiento

- 5 1º Paso: activación de la nproCPB mediante escisión con tripsina
 2º Paso: cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-Sephacel
 3º Paso: cromatografía hidrófoba con butil-sefarosa

De este proceso resulta una npCPB pura.

Activación de pronpCPB mediante escisión con tripsina

Tripsina obtenida de	páncreas de porcino 1645 U/mg o páncreas de porcino 15000 U/mg o páncreas de bovino 9280 U/mg
Relaciones de concentración (tripsina: pronpCPB)	entre 1:1 y 1:1000

Valores de pH	entre pH 6,5 y pH 8,5
Tiempo de escisión	entre 10 min y 17 h
Temperatura	entre 4 y 30°C
Tiempo de activación en el procedimiento de procesamiento	- excedente de fermentación sin tratamiento posterior - después de precipitación con PEG y diálisis - después de la cromatografía con DEAE

Cromatografía de intercambio aniónico

Gel de intercambio aniónico	DEAE-Sephacel o Q-sefaraosa
Volumen de columna	5 a 500 ml
Tampón de elución	Tris/acetato 20 mM + ZnCl ₂ 0,1 mM pH 7,5 o pH 8
Gradiente continuado	NaCl 0 a 250mM NaCl o NaCl 0 a 500mM
Gradiente escalonado	NaCl entre 500 mM y 1000 mM
Longitud de gradiente	entre 1 y 5 veces el volumen de la columna
Carga (CPB/ml gel de intercambio aniónico)	entre 10 y 64 U/ml

Cromatografía hidrófoba (HIC)

Gel HIC	Toyopearl Butilo 650M
Volumen de columna	entre 25 y 50 ml
Tampón de elución	Tris/acetato 20 mM + ZnCl ₂ 0,1 mM pH 7,5
Gradiente continuo	Sulfato de amonio 1000 mM a 0 mM
Gradiente escalonado	Tris/acetato 20 mM + ZnCl ₂ 0,1 mM pH 7,5
Longitud de gradiente	entre 4 y 10 veces el volumen de columna
Carga (CPB/ml de gel HIC)	entre 29,2 y 183 U/ml

5

Actividad enzimática

Para determinar la actividad específica de la carboxipeptidasa B (CPBnp) recombinante y de la carboxipeptidasa B proveniente de páncreas de porcino (*CPBpig*) se procede del siguiente modo. En primer lugar se determina la actividad del volumen de la CPB. Como solución de sustrato se disuelve Hipuril-arginina 0,015 M (empresa Sigma) en tampón Tris/HCl 0,05 M, pH 7,8. Además se necesita un tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,8. La solución de reacción está compuesta por 0,5 ml de tampón Tris, 0,1 ml de la solución del sustrato y 0,385 ml de agua destilada. La reacción se inicia con la solución enzimática 1717 µl de CPB. La medición fotométrica (ΔE) se efectúa durante 1 min en una cubeta de vidrio de cuarzo con un espesor de capa de 0,5 cm, a una temperatura de 25°C y una longitud de onda de λ= 254 nm. La actividad de la CPB se calcula según la siguiente fórmula.

10

15

$$CPB[U / mL] = \frac{\Delta E * 1002 * \text{dilución}}{0,349 * 0,5 * \text{solución enzimática usada}}$$

La correspondiente concentración de proteína de la solución enzimática se determina fotométricamente con una longitud de onda de 280 nm en una cubeta de vidrio de cuarzo con un espesor de capa de 1 cm y una temperatura entre 20 y 25°C. En primer lugar se determina el valor en vacío al medir solamente la absorción del tampón de la

20

muestra (E (valor en vacío)). El tampón de la muestra se compone de Tris/HCl 0,033 M, pH 8,0. Después se diluyen 0,05 ml de solución de CPB en 3 ml de tampón de muestra y también se determina la absorción (E (muestra)). La concentración de proteína se calcula según la siguiente fórmula.

$$5 \quad \text{Contenido de proteína} \quad \frac{10 \text{ g}}{\text{L}} * \Delta E (\text{muestra}) \\ \text{[mg/ml]} \quad \Big| = \frac{\quad}{21,4} * 61$$

$$\Delta E (\text{muestra}) = E (\text{muestra}) - E (\text{valor en vacío})$$

Enzima	Actividad	Contenido de proteína	Actividad específica
npCPB	92,6 U/ml	0,31 mg/ml	298,7 U/mg
pigCPB (Archivo 28754, empresa Merck)	244,4U/ml	0,94mg/ml	260,0 U/mg

Listado de Secuencias

- 10 [0042]
 <110> Merck Biosciences <120> CPB
 <130> 052083WO
 <160> 11
 <170> Patente en versión 3.1
- 15 <210> 1
 <211> 413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 20 <223> Fragmento de CPB
 <400> 1
- ```

acgaggaatt ccatatgcac cactctggtg aacacttcga aggtgaaaag gttttcagag 60
ttaacgttga agacgaaaac cacattaaca ttttgacga attggcttct actactcaa 120
ttgacttctg gaagccagac tctgttactc aaattaagcc acactctact gttgacttca 180
gagttaaggc tgaagacatt ttgactggtg aagacttctt gaagcaaac gaattgcaat 240
acgaagtttt gattaacaac ttgagatcag ttttggaagc tcaattcgac tccagagtta 300
gaactactgg tcactcttac gaaaagtaca acaactggga aactattgaa gcatggactc 360
aacaagttac ttctgaaaac ccagacttga tttctagaag cgctattggt acc 413

```
- <210> 2  
 <211> 442
- 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Fragmento de CPB  
 <400> 2

ES 2 369 781 T3

actttcgaag gtagaactat ttacttggtg aaggttgga agccagggtc taacaagcca 60  
 gctattttca tggactgtgg tttccacgct agagaatgga tttctccagc tttctgtcaa 120  
 tggttcgtta gagaagctgt tagaacttac ggtagagaaa ttcacatgac tgaattggtg 180  
 gacaagttgg acttctacgt tttgccagtt ttgaacattg acggttacat ttacacttgg 240  
 actaagaaca gaatgtggag aaagactagg tctactaacg ctggttcttc ttgtactggt 300  
 actgacccaa acagaaactt cgacgctggt tgggtgttcta ttggtgcttc aagaaacca 360

tgtgacgaaa cttactgtgg ttctgctgct gaatctgaaa aggaaactaa ggctttggct 420  
 gacttcatta gaaacaactt gt 442

<210> 3

<211> 386

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de CPB

<400> 3

cgactattaa ggcttacttg actattcact cttactctca aatgatggtg taccataact 60  
 cttacgacta caagttgcc aaaaacaacg ctgaattgaa cgctttggct aaggetactg 120  
 ttaaggaatt ggcttctttg cacggtacta agtattctta cgggccaggt gctactacta 180  
 tttaccagc tgctgggtgt tctgacgact gggcttacga ccaaggtatt aagtactctt 240  
 tcaacttcga attgagagac aagggtagat acggtttctg tttgccagaa tctcaaattc 300  
 aaccaacttg tgaagaaact atggttgcta ttaagtagct tacttcttac gttttggaac 360  
 acttgtacta accatggatc cagagc 386

10 <210> 4

<211> 413

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 4

acgaggaatt ccatatgcac cactctggtg aacacttcga aggtgaaaag gttttcagag 60  
 ttaacgttga agacgaaaac gacatttctg aattgcacga attggcttct actagacaaa 120  
 ttgacttctg gaagccagac tctgttactc aaattaagcc aactctact gttgacttca 180  
 gagttaaggc tgaagacatt ttggctggtg aagacttctt ggaacaaaac gaattgcaat 240  
 acgaagtttt gattaacaac ttgagatcag ttttggaagc tcaattcgac tccagatgta 300  
 gaactactgg tcaactcttac gaaaagtaca acaactggga aactattgaa gcatggactg 360  
 aacaagttac ttctaagaac ccagacttga tttctagaag cgctattggt acc 413

15

<210> 5

ES 2 369 781 T3

<211> 442

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 5

```

actttcgacg gtgacaacat ttacttggtg aaggttggta agccagggtc taacaagcca 60
gctattttca tggactgtgg tttccacgct agagaatgga tttctcaagc tttctgtcaa 120
tggttcgtta gagacgctgt tagaacttac ggttacgaag ctccacatgac tgagttcttg 180
gacaacttgg acttctacgt tttgccagtt ttgaacattg acggttacat ttacacttgg 240
actaagaaca gaatgtggag aaagactagg tctactaacg ctggttcttc ttgtactggt 300
actgacccaa acagaaactt caacgctggg tgggtgactg ttgggtgcttc tgtgaaccca 360
tgtaacgaaa cttactgtgg ttctgctgct gaatctgaaa aggaaactaa ggctttggct 420
gacttcatta gaaacaactt gt 442

```

5

<210> 6

<211> 383

<212> ADN

<213> Sus Scrofa

<400> 6

10

```

cgactattaa ggcttacttg actattcact cttactctca aatgattttg taccataact 60
cttacgacta caagttgccg gaaaacgacg ctgaattgaa ctctttggct aagggtgctg 120
ttaaggaatt ggcttctttg tacggctactt cttactctta cgggccaggt tctactacta 180
tttaccocagc tgctgggtgg tctgacgact gggcttacia ccaaggtatt aagtactctt 240
tcactttcga attgagagac aagggtagat tgggttctgt tttgccagaa tctcaaattc 300
aagctacttg tcaagaaact atggtggctg ttaagtacgt tactaactac actttggaac 360
acttgtaacc atggatccag agc 383

```

<210> 7

<211> 402

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nueva CPB <400> 7

```

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

```

ES 2 369 781 T3

His Ser Thr Val Asp Phe Arg Val Lys Ala Glu Asp Ile Leu Thr Val  
 50 55 60  
 Glu Asp Phe Leu Lys Gln Asn Glu Leu Gln Tyr Glu Val Leu Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Arg Ser Val Leu Glu Ala Gln Phe Asp Ser Arg Val Arg Thr  
 85 90 95  
 Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Asn Trp Glu Thr Ile Glu Ala  
 100 105 110  
 Trp Thr Gln Gln Val Thr Ser Glu Asn Pro Asp Leu Ile Ser Arg Ser  
 115 120 125  
 Ala Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Thr Ile Tyr Leu Leu Lys Val  
 130 135 140  
 Gly Lys Pro Gly Ser Asn Lys Pro Ala Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe  
 145 150 155 160  
 His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg  
 165 170 175  
 Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile His Met Thr Glu Leu Leu  
 180 185 190  
 Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr  
 195 200 205  
 Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Asn Arg Met Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr  
 210 215 220  
 Asn Ala Gly Ser Ser Cys Thr Gly Thr Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Trp Cys Ser Ile Gly Ala Ser Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr  
 245 250 255  
 Tyr Cys Gly Ser Ala Ala Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala  
 260 265 270  
 Asp Phe Ile Arg Asn Asn Leu Ser Thr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 275 280 285  
 His Ser Tyr Ser Gln Met Met Leu Tyr Pro Tyr Ser Tyr Asp Tyr Lys  
 290 295 300  
 Leu Pro Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr Lys Tyr Ser Tyr Gly Pro Gly  
 325 330 335  
 Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ala Tyr  
 340 345 350

ES 2 369 781 T3

Asp Gln Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Lys Gly  
 355 360 365  
 Arg Tyr Gly Phe Val Leu Pro Glu Ser Gln Ile Gln Pro Thr Cys Glu  
 370 375 380  
 Glu Thr Met Leu Ala Ile Lys Tyr Val Thr Ser Tyr Val Leu Glu His  
 385 390 395 400  
 Leu Tyr

<210> 8

<211> 401

<212> PRT

5 <213> Sus scrofa

<400> 8

His His Ser Gly Glu His Phe Glu Gly Glu Lys Val Phe Arg Val Asn  
 1 5 10 15  
 Val Glu Asp Glu Asn Asp Ile Ser Glu Leu His Glu Leu Ala Ser Thr  
 20 25 30  
 Arg Gln Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Val Thr Gln Ile Lys Pro  
 35 40 45  
 His Ser Thr Val Asp Phe Arg Val Lys Ala Glu Asp Ile Leu Ala Val  
 50 55 60  
 Glu Asp Phe Leu Glu Gln Asn Glu Leu Gln Tyr Glu Val Leu Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Arg Ser Val Leu Glu Ala Gln Phe Asp Ser Arg Cys Arg Thr  
 85 90 95  
 Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Asn Trp Glu Thr Ile Glu Ala  
 100 105 110  
 Trp Thr Glu Gln Val Thr Ser Lys Asn Pro Asp Leu Ile Ser Arg Ser  
 115 120 125  
 Ala Ile Gly Thr Thr Phe Asp Gly Asp Asn Ile Tyr Leu Leu Lys Val  
 130 135 140  
 Gly Lys Pro Gly Ser Asn Lys Pro Ala Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe  
 145 150 155 160  
 His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Gln Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg  
 165 170 175  
 Asp Ala Val Arg Thr Tyr Gly Tyr Glu Ala His Met Thr Glu Phe Leu

ES 2 369 781 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     | 180 |     | 185 |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Asn | Leu | Asp | Phe | Tyr | Val | Leu | Pro | Val | Leu | Asn | Ile | Asp | Gly | Tyr |  |  |  |  |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Tyr | Thr | Trp | Thr | Lys | Asn | Arg | Met | Trp | Arg | Lys | Thr | Arg | Ser | Thr |  |  |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Ala | Gly | Ser | Ser | Cys | Thr | Gly | Thr | Asp | Pro | Asn | Arg | Asn | Phe | Asn |  |  |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Ala | Gly | Trp | Cys | Thr | Val | Gly | Ala | Ser | Val | Asn | Pro | Cys | Asn | Glu | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |  |  |
| Tyr | Cys | Gly | Ser | Ala | Ala | Glu | Ser | Glu | Lys | Glu | Thr | Lys | Ala | Leu | Ala |  |  |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Phe | Ile | Arg | Asn | Asn | Leu | Ser | Thr | Ile | Lys | Ala | Tyr | Leu | Thr | Ile |  |  |  |  |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |  |  |
| His | Ser | Tyr | Ser | Gln | Met | Ile | Leu | Tyr | Pro | Tyr | Ser | Tyr | Asp | Tyr | Lys |  |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Pro | Glu | Asn | Asp | Ala | Glu | Leu | Asn | Ser | Leu | Ala | Lys | Gly | Ala | Val |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |  |  |
| Lys | Glu | Leu | Ala | Ser | Leu | Tyr | Gly | Thr | Ser | Tyr | Ser | Tyr | Gly | Pro | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |  |  |
| Ser | Thr | Thr | Ile | Tyr | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ser | Asp | Asp | Trp | Ala | Tyr |  |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Gln | Gly | Ile | Lys | Tyr | Ser | Phe | Thr | Phe | Glu | Leu | Arg | Asp | Lys | Gly |  |  |  |  |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     | 365 |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Phe | Gly | Phe | Val | Leu | Pro | Glu | Ser | Gln | Ile | Gln | Ala | Thr | Cys | Gln |  |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     | 380 |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Thr | Met | Leu | Ala | Val | Lys | Tyr | Val | Thr | Asn | Tyr | Thr | Leu | Glu | His |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |  |  |
| Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

<210> 9

<211> 441

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de CPB

<400> 9

ES 2 369 781 T3

atggttggegt tcttgattct tgtgactgtg actctagcat ctgctcatca ttctggtgag 60  
 cactttgaag gtgagaaggt gttccgtgtc aatggtgaag atgaaaatga catcagotta 120  
 ctccatgagt tggccagcac caggcagatt gacttctgga aaccagattc tgtcacacaa 180  
 atcaaacctc acagtacagt tgacttccgc gtgaaagcag aagatatttt ggctgtggaa 240  
 gactttctgg agcagaatga actacaatat gaggtactca taaacaacct gagatctgtg 300  
 ctagaggctc agtttgacag cagagtccgt acaactggac acagttatga gaagtacaac 360  
 aactgggaaa cgatagaggc ttggactaag caagtcacca gtgaaaatcc agacctcatc 420  
 tctcgcacag ccatcggaac t 441

<210> 10 <211> 442

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Fragmento de CPB

<400> 10

acatTTTTtag gaaacaatat atacctcctc aagggttgca aacctggacc aaataagcct 60  
 gccatTTTca tggactgtgg tttccatgcc agagaatgga tttcccatgc atTTtgccag 120  
 tggTTTgtga gagaggctgt tctcacctat ggatatgaga gtcacatgac agaattcctc 180  
 aacaagctag actTTTatgt cttgcctgtg ctcaatattg atggctacat ctacacctgg 240  
 accaagaacc gaatgtggag aaagaccgcc tctaccaatg ctggaactac ctgcattggc 300  
 acagacccca acagaaattt tgatgctggg tggTgcacaa ctggagcctc tacagacccc 360  
 tgcgatgaga cttactgtgg atctgctgca gagtctgaaa aagagaccaa ggccctggct 420  
 gatTTTatac gcaacaacct ct 442

<210> 11 <211> 368

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de CPB

<400> 11

cctccatcaa agcatacctg acgatccact catactcaca gatgatactc tacccttatt 60  
 cctatgatta caaactcccc gagaacaatg ctgagttgaa taacctggct aaggctgccg 120  
 15 tgaaagaact tgctacactg tatggcacca agtacacata cggcccagga gctacaacaa 180  
 tctatcctgc tgctgggggc tctgatgact gggcttatga ccaaggaatc aaatattcct 240  
 tcacctttga actccgggat aaaggcagat atggTTTTat cctccctgaa tcccagatcc 300  
 aggcaacctg tgaggaaaca atgctggcca tcaaatcgt aaccaactac gtgctgggcc 360  
 acctgtaa 368

**REIVINDICACIONES**

1. Un ácido nucleico que codifica para la procarboxipeptidasa B (Pro-CPB) que comprende tres segmentos A, B y C, donde el segmento A presenta la sec. ID N° 1, el segmento B presenta la sec. ID N° 2 y el segmento C presenta la sec. ID N° 3.
- 5 2. Una procarboxipeptidasa que se puede obtener mediante la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Una carboxipeptidasa B que se puede obtener mediante la escisión de la prosequencia de pro-CPB de acuerdo con la reivindicación 2 utilizando tripsina.
- 10 4. La carboxipeptidasa de acuerdo con la reivindicación 3 con una actividad enzimática de al menos 200 U/mg.
5. Un vector de expresión que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Un organismo transformado no humano que contiene un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
- 15 7. Un procedimiento para la expresión de pro-CPB de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende los pasos:
  - fermentación de un organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 6,
  - inducción de la expresión,
  - purificación de la pro-CPB.
- 20 8. Un procedimiento para la expresión de la carboxipeptidasa B de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 que comprende los pasos de:
  - fermentación de un organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 6,
  - inducción de la expresión,
  - activación mediante la escisión de la pro-CPB en CPB,
  - purificación de la CPB.
- 25 9. Una procarboxipeptidasa que posee la secuencia de acuerdo con la Sec. ID N° 7.
- 30 10. Una proteína con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Sec. ID N° 8 que comprende al menos 5 mutaciones seleccionadas del grupo D22H, S24N, E25I, R33T, A63T, E69K, C94V, E115Q, K120E, D135E, D137R, N138T, Q168P, D177E, Y184R, A186I, F191L, N194K, N240D, T245S, V246I, V250R, N254D, I295M, D309N, S314A, G318A, A319T, Y327H, S330K, S337A, N353D, F370Y, A381P, Q384E, V390I, N395S, T397V.