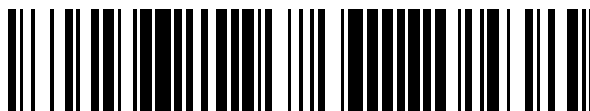


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 657**

51 Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06791678 .3**
96 Fecha de presentación: **26.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1926749**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **ESCISIÓN DE PRECURSORES DE INSULINAS MEDIANTE UNA VARIANTE DE TRIPSINA.**

30 Prioridad:
14.09.2005 EP 05077086

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
BRÜNINGSTRASSE 50
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE y
F.Hoffmann-La Roche AG**

72 Inventor/es:
**GEIPEL, Frank;
GLASER, Stephan;
HOH, Christoph;
KOPETZKI, Erhard;
MUELLER, Rainer y
ZOCHER, Frank**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 657 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

Escisión de precursores de insulinas mediante una variante de tripsina

5 La presente invención se refiere a la producción de una variante de tripsina recombinante con especificidad incrementada del sustrato para arginina frente a lisina en organismos huéspedes no animales. Además, la presente invención se refiere a una variante de tripsina recombinante y a su producción. También se proporciona el uso de variantes de tripsina pancreática porcina recombinante para la escisión de precursores de insulinas, y kits que contienen la variante de tripsina.

10 La tripsina es una serina proteasa que cataliza la escisión hidrolítica de péptidos en el grupo carboxilo de los aminoácidos básicos arginina y lisina (Keil B., (1971). The Enzyme Vol II, 3ª Edición, Editor Boyer, Acad. Press NY. Págs. 249-275). La tripsina pancreática porcina recombinante tiene un peso molecular de aproximadamente 23.000 daltons y un óptimo de actividad enzimática a pH 8,0.

15 La tripsina se utiliza en el proceso industrial para producir insulina y análogos de insulina. La producción de estas biomoléculas se describe en la bibliografía y se han elegido varios enfoques. Desde un punto de vista económico, no es factible la síntesis química de insulina humana y análogos de insulina. Por lo tanto, actualmente existen principalmente dos procedimientos para la producción de insulina y análogos de insulina, a saber el enfoque semi-sintético utilizando insulina porcina como material de partida, y el uso de microorganismos genéticamente modificados para la expresión de insulina recombinante.

20 La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos, los cuales se dividen en 2 cadenas de aminoácidos: la cadena A, que tiene 21 aminoácidos, y la cadena B, que tiene 30 aminoácidos. Las cadenas están conectadas una a otra por medio de 2 puentes disulfuro. Las preparaciones de insulina se han empleado para la terapia de diabetes durante muchos años. Aquí no sólo se utilizan insulinas existentes en la naturaleza, sino recientemente también derivados y análogos de insulina.

25 Los análogos de insulina son análogos de insulinas existentes en la naturaleza, a saber la insulina humana o insulinas animales, que difieren por la sustitución de al menos un resto aminoácido existente en la naturaleza con otros restos aminoácidos y/o la adición/separación de al menos un resto aminoácido de la insulina correspondiente, por lo demás idéntica, existente en la naturaleza. Los restos aminoácidos añadidos y/o reemplazados pueden ser también aquellos que no existen en la naturaleza.

30 Los derivados de insulina son derivados de insulina o un análogo de insulina existentes en la naturaleza, los cuales se obtienen por modificación química. La modificación química puede consistir, por ejemplo, en la adición de uno o más grupos químicos específicos a uno o más aminoácidos.

35 Ejemplos de derivados de insulina son insulina humana B29-N-miristoil-des(B30), insulina humana B29-N-palmitoil-des(B30), insulina humana B29-N-miristoil, insulina humana B29-N-palmitoil, insulina humana B28-N-miristoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28-N-palmitoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B30-N-miristoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B30-N-palmitoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B29-N-(N-palmitoil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(N-litocolil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoil)-des(B30) e insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoil).

40 Análogos de insulina se describen en los documentos EP 0 214 826, EP 0 375 437 y EP 0 678 522. El documento EP 0 214 826 se refiere, entre otros, a sustituciones de B27 y B28. El documento EP 0 678 522 describe análogos de insulina que tienen diversos aminoácidos, preferiblemente prolina, en la posición B29, pero no ácido glutámico.

45 Otros análogos de insulina son insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28 Asp, insulina humana en la que prolina en la posición B28 ha sido sustituida con Asp, Lys, Leu, Val o Ala y en la que en la posición B29 Lys puede estar sustituida con Pro; insulina humana AlaB26; insulina humana des(B28-B30); insulina humana des(B27) o insulina humana des(B30).

El documento EP 0 375 437 incluye análogos de insulina con lisina o arginina en B28, que pueden estar opcionalmente modificados adicionalmente en B3 y/o A21.

En el documento EP 0 419 504 se describen análogos de insulina que están protegidos frente a modificaciones químicas, en las que están modificados la asparagina en B3 y al menos un aminoácido más en las posiciones A5, A15, A18 o A21. En el documento WO 92/00321 se describen análogos de insulina en los que al menos un aminoácido de las posiciones B1-B6 está reemplazado por lisina o arginina.

50 Importantes análogos de insulina comentados en esta memoria adicionalmente son "insulina glargina" (insulina humana Gly A(21), Arg B (31), Arg B (32)) e "insulina glulisina" (insulina humana Lys B(3), Glu B(29)).

Procedimientos de ADN recombinante permiten preparar en microorganismos precursores de insulina o análogos de insulina, en particular proinsulina humana o proinsulina que tiene una secuencia de aminoácidos y/o una longitud de cadena de los aminoácidos que difieren de la insulina humana. Las proinsulinas preparadas a partir de células de *Escherichia coli* genéticamente modificadas no tienen puentes cisteína correctamente unidos. Un procedimiento para obtener insulina humana utilizando *E. coli* (documento EP 0 055 945) se basa en las siguientes etapas de procedimiento:

Fermentación del microorganismo, separación de células, disgregación de células, aislamiento del precursor de insulina o análogo de insulina, re-plegamiento a la estructura tridimensional (nativa) deseada mediante la formación de los respectivos puentes disulfuro para proporcionar la o las pre-pro-insulinas ("PPI"), la escisión triptica de la respectiva pre-pro-insulina (posiblemente en presencia de carboxipeptidasa B), purificación básica, primera etapa cromatográfica, escisión enzimática final para proporcionar insulina humana o el respectivo análogo de insulina, segunda etapa cromatográfica y purificación final mediante HPLC, cristalización y secado.

La escisión triptica de las pre-pro-insulinas es una reacción enzimática y compleja: la pre-secuencia y el péptido C se separan por escisión en esta etapa con el fin de proporcionar los productos respectivos. Por ejemplo, en el caso de la producción de insulina humana, los componentes valiosos deseados son insulina Arg(B31), Arg(B32) e insulina Arg(B31) (documento DE19821866).

Sin embargo, la escisión triptica conduce a la formación de muchos productos secundarios como resultado de la ocurrencia de reacciones secundarias indeseadas. La tripsina es una endoproteasa (tipo serina) que escinde los enlaces péptido en los restos arginina (Arg) o lisina (Lys) C-terminales. La escisión triptica de moléculas de pre-pro-insulina puede producirse simultáneamente en diferentes sitios de escisión. Debido a los muchos sitios de escisión dentro de una molécula de pre-pro-insulina específica, se pueden formar muchos productos secundarios indeseados durante la reacción de escisión triptica. Como se puede ver en la Figura 1, muchos de los productos secundarios generados durante las reacciones de escisión son una consecuencia de la escisión del enlace péptido en el lado C-terminal de restos Lys en lugar de restos Arg.

Para todas las pre-pro-insulinas, el sitio de escisión entre la pre-secuencia y la cadena B de la insulina es monobásico. En esta unión, sólo puede producirse una reacción de escisión.

En las otras dos uniones – cadena B/péptido C y péptido C/cadena A – existen diferentes sitios de escisión. En el caso de la insulina humana y la insulina glargina los sitios de escisión entre cadena B/péptido C y péptido C/cadena A son ambos dibásicos (Arg-Arg y Lys-Arg, respectivamente). Además, la escisión detrás de B29-Lys conduce a la formación de B30-des-Thr ("des-Thr").

Para la insulina humana solamente la escisión triptica detrás de los restos B31-Arg y B32-Arg proporciona productos valiosos para la unión cadena B/péptido C, a saber insulina B31-Arg ("mono-Arg") e insulina B31-Arg, B32-Arg ("di-Arg"). Estos productos pueden resumirse como "insulinas Arg". La escisión detrás de B32-Arg es crucial en el proceso para producir insulina glargina, ya que solamente se puede utilizar insulina Di-Arg. Para la insulina humana e insulina glargina, la escisión detrás de B29-Lys resulta en la formación de des-Thr. Para la insulina glulisina, este sitio de escisión es monobásico y productos posibles son especies que contienen Arg.

En relación con el péptido C/cadena A, la escisión triptica detrás del resto Arg y no del resto Lys es crucial para proporcionar valiosos productos. La escisión falsa detrás de Lys resulta en la formación de productos secundarios A0.

Con el fin de superar las desventajas del estado conocido de la técnica, se desea utilizar en el procedimiento de escisión de pre-proinsulina una enzima tripsina con una especificidad reforzada para Arg para los diferentes sitios de escisión tal como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 1. Al aumentar la especificidad para Arg de una enzima tripsina – y, por consiguiente, al disminuir la especificidad para Lys – se puede esperar la formación de productos secundarios, especialmente componentes des-Thr y A0. Sichler et al., FEBS Lett. (2002) 530:220-224, examinaron en la tripsina humana el impacto de un intercambio de aminoácido en la posición 190 (numeración del quimotripsinógeno de acuerdo con Huber, R. y Bode, W., Acc. Chem. Res. (1978) 11:114-122). Se encontró que en esta posición un intercambio de serina de tipo salvaje a alanina mutante provocó un aumento de la selectividad del sitio de escisión para arginina y una disminución para lisina cuando se utilizan sustratos artificiales. Al mismo tiempo, se encontró que la actividad enzimática del mutante disminuía en un factor de aproximadamente 2 cuando se comparaba con el tipo salvaje. El ensayo de tripsina de tipo salvaje humana, recombinante y de mutante de tripsina humana (intercambio de aminoácido en la posición 190 de serina a alanina) para el procesamiento de pre-pro-insulina dio como resultado la formación de grandes cantidades de productos secundarios para las dos enzimas, revelando que no se podía asignar un aumento de la selectividad para Arg para la escisión de la pre-pro-insulina (véase más abajo, Ejemplo 1).

A la vista del estado conocido de la técnica el problema a resolver es proporcionar una variante de tripsina que exhiba una selectividad del sitio de escisión incrementada para arginina sin una gran pérdida de actividad proteolítica. Otro problema particular a resolver es proporcionar una variante de tripsina que tenga una selectividad del sitio de escisión incrementada para restos arginina dentro de los sitios de escisión para el procesamiento de pre-pro-insulina, tal como se muestra de modo ejemplar en la Figura 1.

Por consiguiente, el problema se resuelve al proporcionar una variante de tripsina de porcino con un intercambio de aminoácido en la posición 172 de serina a alanina. En una realización preferida, la variante Ser172Ala de tripsina porcina se proporciona por medios recombinantes. Sorprendentemente, se encontró que la actividad enzimática de la variante Ser172Ala de tripsina porcina era casi igual para las reacciones de escisión de pre-pro-insulina cuando se compara con la enzima de tipo salvaje.

El aminoácido serina en la posición 190 examinado en tripsina humana por parte de Sichler et al. (FEBS Lett. (2002) 530:220-224) corresponde a la serina en la posición 172 de tripsina porcina como se indica en la SEQ ID NO: 1. Ambas posiciones son parte del denominado sitio S1 de serina proteasas similares a tripsina.

Una realización de la invención es un procedimiento para la preparación de insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina, en el que

1. (a) una pre-pro-insulina, un análogo de pre-pro-insulina o un derivado de pre-pro-insulina se escinde con tripsina porcina Ser172Ala,

2. (b) los productos de la escisión resultantes se separan y

(aa) si uno de los productos de la escisión es un análogo de insulina o un derivado de insulina, se obtiene este análogo de insulina o derivado de insulina, o

(bb) siendo esos productos de la escisión precursores de insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina se procesan adicionalmente, y la insulina, el análogo de insulina o el derivado de insulina que resultan de dicho procesamiento adicional se separa y se obtiene;

en donde la insulina es preferiblemente insulina humana; y el análogo de insulina se selecciona de un grupo que comprende insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28 Asp, insulina humana en la que prolina en la posición B28 ha sido sustituida con Asp, Lys, Leu, Val o Ala y en que en la posición B29 Lys puede estar sustituida con Pro; insulina humana AlaB26; insulina humana des(B28-B30); insulina humana des(B27) e insulina humana des(B30), y el derivado de insulina se selecciona del grupo que comprende insulina humana B29-N-miristoil-des(B30), insulina humana B29-N-palmitoil-des(B30), insulina humana B29-N-miristoil, insulina humana B29-N-palmitoil, insulina humana B28-N-miristoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28-N-palmitoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B30-N-miristoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B30-N-palmitoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B29-N-(N-palmitoil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(N-litocolil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoil)-des(B30) e insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoil).

En una realización preferida de la invención, el análogo de insulina es insulina glulisina o insulina glargina.

En una realización adicional de la invención, el mencionado procesamiento adicional de los productos de la escisión que son precursores de insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina comprende una escisión de dichos productos con carboxipeptidasa B, excepto para la insulina glargina.

En otra realización de la invención, la escisión con tripsina porcina Ser172Ala se efectúa a un valor del pH en el intervalo de 7,5 a 9,5, preferiblemente 8,3; una temperatura entre 1°C y 30°C, más preferiblemente entre 8 y 15 °C, lo más preferiblemente a 8°C; y la reacción enzimática se detiene al acidificar la muestra, preferiblemente añadiendo solución de HCl 1N o 2N.

Otra realización de la invención es tripsina porcina Ser172Ala caracterizada por la secuencia SEQ ID. NO: 3, un ADN que codifica la tripsina porcina Ser172Ala, preferiblemente caracterizado por la secuencia SEQ ID. NO : 4.

Otra realización de la invención es un ADN que codifica tripsinógeno porcino Ser196Ala, caracterizado por la SEQ ID NO:6. El péptido señal de este pre-tripsinógeno se deriva del factor alfa de Saccharomyces cerevisiae.

Otra realización de la invención es un vector que comprende un ADN según se describe arriba.

Otra realización de la invención es un método para producir tripsina porcina Ser172Ala caracterizada por la SEQ ID NO:3, que comprende las etapas de

1 (a) proporcionar un vector según la reivindicación 16,

- 2 (b) transformar con el vector una cepa huésped microbiana,
- 3 (c) cultivar la cepa huésped microbiana transformada en un medio de crecimiento que contiene nutrientes, con lo que la cepa huésped microbiana expresa la tripsina porcina Ser172Ala o el tripsinógeno porcino Ser196Ala,
- 5 4 (d) en el caso de que el producto de expresión de (c) sea tripsinógeno porcino Ser196Ala, conversión en tripsina porcina Ser172Ala madura, y
- 5 5 (e) purificar la tripsina porcina Ser172Ala procedente de la cepa huésped microbiana y/o el medio de crecimiento,

10 en particular en donde la cepa huésped microbiana es una cepa de levadura metilotrónica seleccionada de un grupo que comprende especies de *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*; preferiblemente, en donde la cepa huésped microbiana se selecciona de un grupo que comprende *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y *Torulopsis glabrata*.

15 En este documento, los términos “variante tripsina porcina” y “variante de tripsina porcina” significan una proteína que es una variante, es decir, una forma alélica de la isoforma I de la proteína tripsina pancreática porcina madura, generada por medio de una sustitución de un aminoácido en la posición 172 de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

20 Para los fines de una designación abreviada de la variante de tripsina porcina descrita en esta memoria, se señala que el número se refiere al resto/posición del aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la tripsina pancreática porcina madura tal como se indica en la SEQ ID NO: 1. La identificación del aminoácido utiliza las abreviaturas de tres letras, así como el alfabeto de una sola letra de aminoácidos, es decir Asp D ácido aspártico, Ile I isoleucina, Thr T treonina, Leu L leucina, Ser S serina, Tyr Y tirosina, Glu E ácido glutámico, Phe F fenilalanina, Pro P prolina, His H histidina, Gly G glicina, Lys K lisina, Ala A alanina, Arg R arginina, Cys C cisteína, Trp W triptófano, Val V valina, Gln Q glutamina, Met M metionina, Asn N asparagina. Un aminoácido en una posición particular en una secuencia de aminoácidos se indica mediante su abreviatura de tres letras y un número. Por consiguiente, Ser172 significa el resto serina en la posición 172 del aminoácido en SEQ ID NO: 1. Una sustitución con un aminoácido diferente se indica como la abreviatura de tres letras añadida detrás del número que indica la posición. P. ej., “Ser172Ala” significa la sustitución de Ser en la posición 172 en SEQ ID NO: 3 por Ala.

25 La expresión “selectividad incrementada del sitio de escisión” de una variante de tripsina significa un desplazamiento de la especificidad hacia la escisión hidrolítica, con lo que para la variante el desplazamiento conduce a una escisión preferida en el grupo carboxilo de la argina más que de la lisina.

30 Cuando se cuantifica la actividad triptica, el presente documento se refiere a “unidades” (U). La actividad proteolítica de tripsina y variantes de la misma se cuantifica utilizando un ensayo fotométrico utilizando como sustratos Chromozym TRY, Chromozym TH y Chromozym PL (Roche Diagnostics GmbH). La “actividad proteolítica específica” o “actividad específica” de una preparación dada se define como el número de unidades por mg de proteína en la preparación, determinada por el método descrito en el Ejemplo 9.

35 Una “levadura metilotrónica” se define como una levadura que es capaz de utilizar metanol como su fuente de carbono. La expresión también comprende cepas de laboratorio de la misma. En el caso de que una cepa de levadura metilotrónica sea auxotrófica, y dado que ésta se ha de suplementar con una sustancia auxiliar con contenido en carbono tal como, p. ej., histidina en el caso de una cepa de levadura metilotrónica incapaz de sintetizar este aminoácido en cantidades suficientes, esta sustancia auxiliar se considera como un nutriente, pero no como una fuente de carbono.

40 Un “vector” se define como un ADN que puede comprender, es decir portar, y conservar el fragmento de ADN de la invención, incluidos, por ejemplo, fagos y plásmidos. Estas expresiones se entienden por parte de los expertos en la técnica de ingeniería genética. La expresión “casete de expresión” significa una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína, operativamente enlazada a un promotor y un terminador. En cuanto a vectores que contienen una casete de expresión, el término “vector” y la expresión “casete de expresión” se utilizan como sinónimos.

45 El término “oligonucleótido” se utiliza para una molécula de ácido nucleico, ADN (o ARN), con menos de 100 nucleótidos de longitud.

50 “Transformación” significa introducir ADN en un organismo, es decir un organismo huésped, de modo que el ADN se pueda replicar, ya sea como un elemento extracromosómico o por integración cromosomal.

El término “expresión” y el verbo “expresar” significan la transcripción de secuencias de ADN y/o la traducción del ARNm transcrito en un organismo huésped que resulta en una pre-proteína, es decir no incluyendo procesos post-traducción.

5 Una secuencia de nucleótidos “codifica” un péptido o una proteína cuando al menos una parte del ácido nucleico, o su complemento, se puede traducir directamente para proporcionar la secuencia de aminoácidos del péptido o proteína, o cuando el ácido nucleico aislado se puede utilizar, solo o como parte de un vector de expresión, para expresar el péptido o la proteína in vitro, en una célula huésped procariótica, o en una célula huésped eucariótica.

10 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos reguladora que estimula la transcripción. Estos términos se entienden por parte de los expertos en la técnica de ingeniería genética. Al igual que un promotor, un “elemento de promotor” estimula la transcripción, pero constituye un sub-fragmento de una secuencia de promotor mayor.

15 La expresión “operativamente enlazado” se refiere a la asociación de dos o más fragmentos de ácidos nucleicos en un solo vector de modo que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado con una secuencia codificante, es decir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o una pre-proteína, cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante, es decir que la secuencia codificante se encuentra bajo el control transcripcional del promotor.

El término “polipéptido” o “proteína” significa un polímero compuesto de más de 90 monómeros aminoácidos unidos por enlaces péptido. El término “péptido” significa un oligómero compuesto de 90 o menos monómeros aminoácidos unidos por enlaces péptido. Un “enlace péptido” es un enlace covalente entre dos aminoácidos en el que el grupo α -amino de un aminoácido está unido al grupo α -carboxilo del otro aminoácido.

20 El término o expresión “pro-proteína”, “forma de pro-proteína”, “zimógeno”, “tripsinógeno”, “pre-proteína” o “pre-proteína” significa un producto de traducción primario que es un precursor de una proteína madura, es decir en este caso una proteína resulta de un procesamiento post-traducción de una pre-proteína.

25 La expresión “procesamiento post-traducción” significa las etapas de modificación a las que está sometida una pre-proteína o una pre-pro-proteína con el fin de resultar en una proteína madura en un compartimiento celular o extracelular.

30 Un “péptido señal” es una secuencia señal escindible de aminoácidos presente en la pre-proteína o una pre-proteína en forma de una proteína segregable. Las proteínas transportadas a través de la membrana de la célula, es decir “secretadas”, tienen típicamente una secuencia N-terminal rica en aminoácidos hidrófobos, típicamente de aproximadamente 15 a 30 aminoácidos de longitud. Algunas veces, durante el proceso de paso a través de la membrana, la secuencia señal es escindida por parte de una peptidasa señal (Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (compiladores), Molecular Biology of the Cell, cuarta edición, 2002, Garland Science Publishing). Muchas fuentes de los péptidos señal son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* y similares. Otro ejemplo es el péptido señal porcino de la pre-proteína de tripsinógeno pancreático
35 porcino nativo de acuerdo con SEQ ID NO: 5, posición 1-16. En general, el extremo N de la pre-proteína de esencialmente cualquier proteína segregada es una fuente potencial de un péptido señal adecuado para uso en la presente invención. Un péptido señal también puede ser bipartito y comprende dos péptidos señal que dirigen la pre-proteína a un primer y un segundo compartimientos de la célula. Péptidos señal bipartitos se separan escalonadamente por escisión durante el transcurso de la vía secretora. Un ejemplo específico de ello es el prepro-péptido del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (Waters et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 6209-14).

40 Pre-proteínas con un péptido señal N-terminal están dirigidas para penetrar en la “vía secretora”. La vía secretora comprende los procesos de procesamiento post-traducción y, finalmente, resulta en la secreción de una proteína. La glicosilación y la formación de enlaces disulfuro son procesos que son parte de la vía secretora previos a la secreción. En el presente documento se ha de entender que proteínas segregadas por cepas de levaduras
45 metilotróficas han atravesado la vía secretora.

Descripción detallada de la invención

50 Todas las serina proteasas similares a tripsina comparten una preferencia del sustrato por un resto de carácter básico, lisina o arginina. Mientras que la mutación por intercambio de aminoácidos en una serina correspondiente a la posición 190 de tripsina pancreática humana conduce al desplazamiento deseado en la especificidad en relación con sustratos artificiales, la consecuencia es una disminución de la actividad proteolítica.

Además, la evaluación del mutante de tripsina humana reveló que el desplazamiento observado en la especificidad hacia restos arginina utilizando sustratos artificiales no podía asignarse al procesamiento de pre-pro-insulina. El Ejemplo 1 ilustra la conversión de una pre-pro-insulina con el mutante de tripsina Serina190Alanina humana.

Durante la reacción se forman grandes cantidades de productos secundarios, principalmente componentes B30-des-Thr y A0.

5 No se ha demostrado en qué medida este efecto se aplica igualmente a todas las serina proteasas similares a tripsina. Un modo de elucidar esta cuestión es introducir la mutación por intercambio Ser-Ala en las secuencias de aminoácidos de otra especie de tripsina de mamífero en un sitio dentro de cada secuencia de polipéptidos respectiva correspondiente a la posición 190 del isotipo I de tripsina pancreática humana. Al hacerlo así, los autores de la invención encontraron, sorprendentemente, que una mutación por intercambio en tripsina pancreática porcina aumenta la selectividad del sitio de escisión por la arginina en el procesamiento de pre-pro-insulina y, al mismo tiempo, mantiene un nivel mayor de actividad proteolítica.

10 Una persona experta en la técnica conoce bien métodos para sustituir uno o más restos aminoácidos en una proteína. El Ejemplo 2 ilustra la forma en que un mutante de intercambio de aminoácidos puede ser tratado por ingeniería al nivel de la secuencia codificante de ADN. Sin embargo, son posibles otros métodos. En la presente invención, la secuencia de nucleótidos sintética que codifica el mutante Ser172Ala de tripsina pancreática porcina, tal como se indica en la SEQ ID NO: 4, fue expresada en organismos huéspedes microbianos.

15 La variante de tripsina se produce preferiblemente en forma de proteínas heterólogas en organismos huéspedes microbianos tales como bacterias y hongos. La persona experta en la técnica conoce bien sistemas de expresión bacterianos que existen para una diversidad de huéspedes procarióticos tales como *E. coli*, especies de *Bacillus* y *Staphylococcus*, por nombrar sólo unos pocos. Organismos huéspedes microbianos incluso más preferidos son los hongos. Un ejemplo de un género de hongo preferido es *Aspergillus*. Aún incluso más preferidas son especies de levaduras tales como especies del género *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. Aún incluso más preferidas son cepas de especies de levaduras metilotróficas.

20 Las levaduras metilotróficas tienen las vías bioquímicas necesarias para la utilización de metanol y se clasifican en cuatro géneros, basados en la morfología de la célula y las características de desarrollo: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*. Los sistemas de huéspedes metilotróficos más altamente desarrollados utilizan *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*).

25 La expresión de proteínas heterólogas en levaduras se describe en los documentos de EE.UU. US 5.618.676, US 5.854.018, US 5.856.123 y US 5.919.651.

30 Organismos de levaduras producen un cierto número de proteínas que son sintetizadas intracelularmente, pero que tienen una función fuera de la célula. A estas proteínas extracelulares se alude como proteínas segregadas. Inicialmente, las proteínas segregadas se expresan en el interior de la célula en forma de un precursor, una pre-proteína o una pre-pro-proteína que contiene un péptido señal N-terminal que asegura la dirección eficaz del producto expresado en la vía secretora de la célula, a través de la membrana del retículo endoplásmico. El péptido señal se separa generalmente por escisión a partir del producto deseado durante la translocación. La escisión se efectúa proteolíticamente mediante un péptido señal. Una sub-secuencia particular de aminoácidos del péptido señal es reconocida y escindida por la peptidasa señal. A esta sub-secuencia se la alude como sitio de escisión de la peptidasa señal. Una vez que ha penetrado en la vía secretora, la proteína es transportada al aparato de Golgi. A partir del aparato de Golgi las proteínas se distribuyen a la membrana del plasma, lisosomas y vesículas secretoras.

40 Las proteínas secretadas son confrontadas con diferentes condiciones medioambientales en oposición a proteínas intracelulares. Parte de los procesos de la vía secretora consiste en estabilizar las proteínas extracelulares en maduración. Por lo tanto, pre-proteínas que se hacen pasar a través de la vía secretora de levaduras sufren un procesamiento post-traducción específico. Por ejemplo, el procesamiento puede comprender la generación de enlaces disulfuro para formar reticulaciones intramoleculares. Además, se pueden glicosilar determinados aminoácidos de la proteína.

45 Se han sugerido varios enfoques para la expresión y secreción en levaduras de proteínas heterólogas a las levaduras. El documento EP 0 116 201 describe un proceso mediante el cual proteínas heterólogas a las levaduras son transformadas mediante un vector de expresión que alberga ADN que codifica la proteína deseada, un péptido señal y un péptido que actúa como un sitio de escisión de la peptidasa señal. Se prepara y se hace crecer un cultivo del organismo transformado, y la proteína se recupera a partir de medios de cultivo. Para uso en células de levaduras, se ha encontrado que un péptido señal adecuado es el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (documento US 4.870.008).

50 Durante la secreción, la enzima de levaduras KEX-2 es la peptidasa señal que reconoce una secuencia de lisina-arginina como su sitio de escisión en la pre-proteína. KEX-2 se escinde en la unión a la secuencia de la proteína deseada. Como resultado, el producto génico deseado se desprende y libera de las partes directoras, es decir el

péptido señal de la pre-proteína. La endoproteasa KEX-2 se caracterizó originalmente en la levadura *Saccharomyces* en donde procesa específicamente al precursor del factor α de tipo apareante y un factor exterminador (Julius, D., et al., Cell 37 (1984) 1075-1089). Especies de levaduras metilotróficas tales como *Pichia pastoris* comparten la proteasa de tipo KEX-2 (papel y función similares) con *Saccharomyces cerevisiae* (Werten, M.W., et al., Yeast 15 (1999) 1087-1096).

Una especie de levadura metilotrófica bien establecida, descrita a modo de ejemplo como huésped para la expresión de proteínas recombinantes de alto nivel es *Pichia pastoris* (documentos US 4.683.293, US 4.808.537, US 4.812.405, US 4.818.700, US 4.837.148, US 4.855.231, US 4.857.467, US 4.879.231, US 4.882.279, US 4.885.242, US 4.895.800, US 4.929.555, US 5.002.876, US 5.004.688, US 5.032.516, US 5.122.465, US 5.135.868, US 5.166.329, WO 00/56903). En ausencia de glucosa, *Pichia pastoris* utiliza metanol como fuente de carbono que, al mismo tiempo, es una marca de buena calidad de un organismo metilotrófico. El promotor de alcohol oxidasa (AOX1) indicado en SEQ ID NO: 7 controla la expresión de alcohol oxidasa, que cataliza la primera etapa en el metabolismo del metanol. Típicamente, el 30% de la proteína soluble total en células inducidas por metanol es alcohol oxidasa. Varios vectores de expresión de *Pichia* portan el promotor AOX1 y utilizan metanol para inducir la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas deseadas. Las construcciones de expresión se integran también en el genoma de *Pichia pastoris*, creando un huésped transformado y genéticamente estable.

Al utilizar un vector de expresión que codifica una pre-proteína heteróloga que comprende un péptido señal o un péptido señal con un sitio de escisión de la peptidasa señal, y una proteína deseada, se pueden manipular cepas de levaduras metilotróficas, tales como cepas de *Pichia pastoris*, con el fin de segregar el producto deseado en el medio de crecimiento del cual se puede purificar la proteína segregada.

Puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifiquen la pre-proteína que posean un uso del codón sustancialmente diferente. Los codones se pueden seleccionar para aumentar la tasa a la que se produce la expresión de la pre-proteína en un huésped de expresión de levaduras particular de acuerdo con la frecuencia con la que codones particulares son utilizados por parte del huésped. Otras razones de alterar sustancialmente la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína, sin alterar las secuencias de aminoácidos codificadas, incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen más propiedades deseables, tal como una semivida mayor, que los transcritos producidos a partir de la secuencia que existe en la naturaleza.

El Ejemplo 3 ilustra las etapas de clonación para proporcionar un vector de expresión que codifica la variante de tripsina. Al utilizar un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína que es competente para la expresión, p. ej. operativamente enlazada a un promotor o elemento de promotor y a un terminador o elemento de terminador, así como a secuencias requeridas para una traducción eficaz, el organismo huésped se transforma con el vector, y se seleccionan transformantes.

Por una parte, el rendimiento de expresión depende de una dirección apropiada del producto deseado, p. ej. a la vía secretora por medio de un péptido señal tal como el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* o el péptido señal porcino del tripsinógeno pancreático nativo porcino. El Ejemplo 4 proporciona un huésped microbiano transformado y el Ejemplo 5 muestra la forma en que se puede conseguir la expresión de la variante de tripsina. Por consiguiente, el producto de traducción primario comprende un péptido señal que dirige el polipéptido a la vía secretora. El Ejemplo 6 ilustra la medición de la actividad trípica en el sobrenadante de levaduras metilotróficas transformadas.

Por otra parte, el rendimiento de la expresión se puede incrementar aumentando la dosificación del gen que codifica el producto deseado. Así, se amplifica el número de copias de la construcción de expresión, es decir el vector de expresión o la casete de expresión, en el organismo huésped. Un modo de lograr esto es por transformación múltiple de un vector de expresión que codifica el producto deseado. Otro modo es introducir el gen que codifica el producto deseado en el organismo huésped utilizando un primer y un segundo vectores de expresión, con lo que el vector de expresión se basa en un marcador seleccionable que difiere del marcador seleccionable utilizado en el primer vector de expresión. El segundo vector de expresión que codifica el mismo producto deseado puede ser introducido incluso cuando el organismo huésped porta ya múltiples copias de un primer vector de expresión (documento US 5.324.639; Thill, G.P., et al., Positive and Negative Effects of Multi-Copy Integrated Expression in *Pichia pastoris*, International Symposium on the Genetics of Microorganisms 2 (1990), págs. 477-490; Vedvick, T., et al., J. Ind. Microbiol. 7 (1991) 197-201; Werten, M.W., et al., Yeast 15 (1999) 1087-1096). El Ejemplo 7 describe cómo puede incrementarse el rendimiento de expresión de la variante de tripsina con el fin de proporcionar un clon de levadura para la producción a escala industrial.

Los transformantes se analizan repetidamente con respecto al rendimiento de proteína recombinante segregada en el medio de crecimiento. Se seleccionan los transformantes que segregan las cantidades más elevadas de proteína recombinante enzimáticamente activa.

La secreción de la variante de tripsina porcina en el medio de crecimiento dirige la proteína recombinante madura al espacio extracitoplásmico del que se difunde al medio de crecimiento. Levadura metilotrónica transformada, desarrollada en cultivo líquido, segrega la variante de tripsina pancreática porcina recombinante en el medio de crecimiento líquido, es decir el medio de cultivo líquido. Esto permite una separación muy eficaz de biomasa de levadura a partir de la proteína recombinante utilizando, p. ej., técnicas de filtración. Como resultado, la variante de tripsina porcina recombinante, purificada a partir de esta fuente, se separa de manera muy eficaz de otras actividades de la enzima, tal como ribonucleasa u otras actividades de proteasa (no triptica). Por lo tanto, una primera realización preferida de la invención es una variante, por medio de una sustitución de aminoácido, de tripsina porcina pancreática isotipo I, en donde el aminoácido serina en la posición 172 es sustituido por el resto aminoácido alanina, numerado a partir del extremo N de la tripsina porcina pancreática isotipo I de acuerdo con SEQ ID NO: 1, para formar una variante de tripsina porcina pancreática con actividad de tripsina.

Preferiblemente, la variante de tripsina porcina pancreática tiene una selectividad incrementada del sitio de escisión hacia la escisión hidrolítica en el grupo carboxilo del aminoácido arginina, más que la escisión hidrolítica en el grupo carboxilo del aminoácido lisina.

De manera más preferida, la variante aislada exhibe la selectividad incrementada cuando como sustrato se utiliza un polipéptido precursor de insulina o un análogo del mismo.

Todavía en otra realización preferida de la invención, la actividad proteolítica específica de la variante de tripsina porcina es del 100% comparada con la tripsina porcina pancreática de tipo salvaje. Así, cuando se produce y purifica bajo condiciones equivalentes, la actividad de tripsina específica de la variante de tripsina porcina pancreática recombinante es del 100% cuando se compara con la tripsina porcina pancreática no modificada, es decir la forma de tipo salvaje.

Otra realización preferida de la invención es un método para producir una variante de tripsina porcina pancreática, que comprende las etapas de (a) proporcionar un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de tripsina porcina pancreática, (b) transformar una cepa huésped microbiana con el vector, (c) cultivar la cepa huésped microbiana transformada en un medio de crecimiento que contiene nutrientes, con lo que la cepa huésped microbiana expresa la variante de tripsina porcina pancreática recombinante, y (d) purificar la variante de tripsina porcina pancreática recombinante a partir de la tripsina porcina pancreática procedente de la cepa huésped microbiana y/o el medio de crecimiento.

La eficacia de la traducción de una proteína heteróloga se puede mejorar adaptando los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga de acuerdo con los codones preferidos en el organismo huésped. Así, en una realización preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de tripsina porcina pancreática recombinante es SEQ ID NO: 4.

En una realización incluso más preferida de la invención, (a) el vector comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en el tripsinógeno pancreático porcino recombinante y un péptido señal según se indica en SEQ ID NO: 6, (b) la cepa huésped microbiana es una cepa de levaduras metilotrónicas, (c) el medio de crecimiento contiene metanol como una fuente de carbono, (d) la cepa de levaduras metilotrónicas expresa y segrega la variante de tripsina porcina pancreática recombinante, y (e) la variante de tripsina porcina pancreática se purifica a partir del medio de crecimiento.

Para el mismo fin se pueden utilizar péptidos señal eucarióticos derivados de levaduras, así como no derivados de levaduras, que no sean los mencionados en particular. A pesar de que los péptidos señal pueden no ser escindibles por parte de la peptidasa señal, un péptido de escisión de la peptidasa señal puede ser insertado en la secuencia de aminoácidos de la pre-proteína, es decir entre la secuencia de aminoácidos del péptido señal y la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido de la tripsina pancreática porcina recombinante. Por lo tanto, todavía en otra realización mucho más preferida de la invención, el péptido señal contiene un sitio de escisión de la peptidasa señal que está localizado junto al primer aminoácido (N-terminal) del tripsinógeno pancreático porcino recombinante.

En otra realización preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína está operativamente enlazada a un promotor o elemento de promotor. Se prefiere que el vector sea un plásmido capaz de replicarse en forma de un episoma en la cepa de levaduras metilotrónicas. Se prefiere, además, que un cromosoma artificial, capaz de replicarse en la cepa de levaduras metilotrónicas, contenga el vector. Aún, es más preferido que un cromosoma de la cepa de levaduras metilotrónicas contenga el vector en forma de un componente integrado.

Así, en el método preferido que utiliza cepas de levaduras metilotrónicas y, en particular, cepas de *Pichia pastoris*, el vector codifica una secuencia de aminoácidos para una variante de pre-proteína tripsinógeno pancreático porcino que penetra en la vía secretora.

En una realización adicional preferida de la invención, la cepa de levaduras metilotróficas es una especie de *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* o *Torulopsis*. Se prefiere mucho que la cepa de levaduras metilotróficas se seleccione del grupo consistente en *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y *Torulopsis glabrata*. Incluso se prefiere más que la cepa de levaduras metilotróficas sea la cepa de *Pichia pastoris* con el número de acceso 76273 de American Type Culture Collection o un derivado de la misma.

Otra realización preferida de la invención es una cepa de *Pichia pastoris* con un cromosoma que contiene un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en la variante de tripsina pancreática porcina recombinante y un péptido señal, operativamente enlazada con el promotor AOX1 de *Pichia pastoris* de acuerdo con SEQ ID NO: 7 o un elemento de promotor del mismo.

La persona experta en la técnica es consciente del hecho de que el rendimiento de proteína heteróloga segregada, tal como una variante de tripsina pancreática porcina, obtenible del medio de crecimiento, tal como medio de crecimiento líquido, se puede incrementar cuando se incrementa el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína a partir de la cual se expresa y segrega la proteína heteróloga. Así, el rendimiento de proteína heteróloga segregada, obtenible del medio de crecimiento, se puede incrementar cuando se incrementa el número de copias del vector en el genoma de la cepa de levaduras metilotróficas. Por ejemplo, el número de copias del vector se puede incrementar sometiendo la cepa de levaduras metilotróficas a transformaciones repetidas del vector y a rondas de selección repetidas utilizando concentraciones crecientes del agente selectivo contra el cual confiere resistencia el marcador selectivo comprendido en el vector (documento US 5.324.639; Thill, G.P., et al., Positive and Negative Effects of Multi-Copy Integrated Expression in *Pichia pastoris*, International Symposium on the Genetics of Microorganisms 2 (1990), págs. 477-490; Vedvick, T., et al., J. Ind. Microbiol. 7 (1991) 197-201).

Un ejemplo de un marcador selectivo es el gen *Sh ble*, que es el gen de resistencia a Zeocin® (Drocourt, D., et al., Nucleic Acids Res. 18 (1990) 4009; Carmels, T., et al., Curr. Genet. 20 (1991) 309-314). La proteína codificada por el gen *Sh ble* se une estequiométricamente a Zeocin® y con una fuerte afinidad. La unión de Zeocin® inhibe su actividad tóxica, seleccionando con ello los transformantes que contienen el gen *Sh ble*. Es conocido por una persona experta en la técnica que al incrementar la concentración de Zeocin® en calidad del agente selectivo en el medio se selecciona un incremento en el número de copias del vector que expresa el gen *Sh ble*. Por lo tanto, es ventajoso utilizar un vector con el gen *Sh ble* en calidad de un marcador seleccionable para generar, mediante transformación repetida, múltiples transformantes de la cepa de levaduras metilotróficas que contiene múltiples copias del vector. Además, es ventajoso que se repitan las transformaciones y que se repita la selección de transformantes incluso más resistentes hasta que ya no se obtenga para la cepa de levaduras metilotróficas transformada ningún incremento adicional del nivel de resistencia a Zeocin® o que ya no sea posible ningún incremento adicional de la concentración de Zeocin® en el medio de selección.

Una persona experta en la técnica está familiarizada con la purificación por medio de cromatografía de tripsina pancreática porcina expresada de forma recombinante y segregada (Funakoshi, A., et al., J. Biochem. (Tokyo) 88 (1980) 1113-1138; Paudel, H.K., y Liao, T.H., J. Biol Chem. 261 (1986) 16006-16011; Nefsky, B., y Bretscher, A., Eur. J. Biochem. 179 (1989) 215-219). Se prefiere que una variante del tripsinógeno pancreático porcino en el medio de crecimiento se purifique utilizando cromatografía de intercambio de iones. En el Ejemplo 8 se describen etapas de tratamiento situadas más abajo que conducen al producto purificado. La producción de la isoforma I de tripsina pancreática porcina de tipo salvaje se realizó de forma similar, excepto que para construir el vector de expresión se utilizó la secuencia codificante de tipo salvaje.

Todavía, otra realización preferida de la invención es una variante del isotipo I de tripsina pancreática porcina por uno de los métodos arriba descritos. Otra realización de la invención es el uso de la variante de tripsina pancreática porcina para el procesamiento de pre-pro-insulina. Los beneficios del uso de la variante Ser172Ala de tripsina porcina para la escisión enzimática de diferentes pre-pro-insulinas se describen en los Ejemplos 10-12. Se proporcionan los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se recoge en las reivindicaciones anejas. Se entiende que en los procesos recogidos se pueden realizar modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las Figuras

Figura 1: esquema de sitios de escisión tríptica principales para las pre-pro-insulinas de insulina humana, insulina glargina e insulina glulisina. Los triángulos en negro significan sitios de escisión que proporcionan producto(s), los triángulos en blanco significan sitios de escisión que proporcionan productos secundarios. No se muestran los enlaces disulfuro de las pre-pre-insulinas.

Figura 2: escisión de la pre-pro-insulina glargina con tripsina humana recombinante, de tipo salvaje (Ejemplo 1)

Figura 3: escisión de la pre-pro-insulina glargina con variante de tripsina humana serina190alanina recombinante, de tipo salvaje (Ejemplo 1)

5 Figura 4: mapa del plásmido pTry-Ser172Ala que es un derivado del plásmido pPICZ α A (Invitrogen), comercialmente disponible, que confiere resistencia a Zeocin®. El inserto, denominado TrySer172Ala, es la secuencia de ADN sintético que codifica la variante de tripsinógeno segregado porcino recombinante que porta la sustitución de aminoácidos Ser172Ala y que está fusionada a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. "AOX1-Prom" significa el promotor AOX1 de *Pichia pastoris*, "Term" significa el terminador AOX1 de *Pichia pastoris*

Figura 5: se muestra la escisión de pre-pro-insulina (insulina humana) con la tripsina porcina nativa, recombinante (Ejemplo 10, Tabla 1)

15 Figura 6: se muestra la escisión de pre-pro-insulina (insulina humana) con la variante A172A de tripsina porcina (Ejemplo 10, Tabla 1).

En general, en los siguientes ejemplos se emplearon los métodos sugeridos y descritos en los manuales de Invitrogen "Pichia Expression Kit" Versión M 011102 25-0043, "pPICZ A, B, and C" Versión D 110801 25-0148, "pPICZ α A, B, and C" Versión E 010302 25-0150, y "pPIC9K" Versión E 030402 25-0106. Se hace también referencia a vectores, cepas de levaduras y medios adicionales mencionados en esos manuales. Se aplicaron métodos básicos de biología molecular según se describe en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición, CSHL Press, 2001.

Método HPLC:

Fase estacionaria: Nucleosil 120-5 C18, Macherey & Nagel, 250 x 4 mm; fase móvil A: tampón fosfato de sodio 45 mM (pH 2,5), NaCl 315 mM, acetonitrilo al 25 % (v/v);

25 fase móvil B: tampón fosfato de sodio 45 mM (pH 2,5), NaCl 55 mM, acetonitrilo al 65 % (v/v); Gradiente: lineal, de 6% fase B a 10% fase B en el espacio de 30 min.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención, sin limitarla.

Ejemplo 1: Escisión de pre-pro-insulina glargina utilizando tripsina recombinante humana de tipo salvaje y variante de tripsina humana serina190alanina

30 Estos experimentos se efectuaron a 8°C y a un valor del pH de 8,3 (solución tamponada) y se efectuaron a la escala de 50 mL.

35 La solución de PPI se cargó en un recipiente de reacción con termostato, apropiado, y la reacción se inició mediante la adición de la preparación de enzimas. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo definidos; la reacción enzimática se detuvo inmediatamente al acidificar la solución de la muestra mediante una solución de HCl 1N ó 2N. La concentración de los respectivos productos se determinó mediante HPLC.

Ejemplo 2: Mutagénesis de la secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica tripsinógeno pancreático porcino

40 En general, se aplicaron métodos estándares de biología molecular según se describe en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición, CSHL Press, 2001. El método que se explica abajo es una aplicación específica de un método muy general que también se conoce como "mutagénesis dirigida al sitio".

45 Las mutaciones se generaron de una manera dirigida al sitio utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR - siglas en inglés). Con el fin de mutar un codón deseado, es decir un triplete de bases, se diseñó y sintetizó un par de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla complementarios que representan una porción variante de la secuencia de nucleótidos sintéticos que codifica tripsinógeno pancreático porcino. Los oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla eran idénticos o complementarios a la secuencia indicada en SEQ ID NO: 2, excepto por la

5 secuencia del triplete a mutar. Típicamente, los oligonucleótidos de ADN tenían una longitud de aproximadamente 20 a 45 nucleótidos; la secuencia del triplete a mutar o su complemento estaba localizado en la parte central del oligonucleótido de ADN que la comprendía, y estaba flanqueado por ambos lados por aproximadamente 10 a 12 nucleótidos. Los oligonucleótidos de ADN se diseñaron de tal modo que la hibridación de los oligonucleótidos de ADN al ADN del tripsinógeno pancreático porcino recombinante de `tipo salvaje´ (de acuerdo con SEQ ID NO: 2) dio como resultado híbridos con un error de emparejamiento central, pero con un emparejamiento intacto de bases en los flancos del error de emparejamiento, incluidos los extremos 5' y 3' de cada oligonucleótido de ADN.

10 Adicionalmente, se proporcionaron dos cebadores de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla, de los cuales el primero, designado "5' tripsina" (SEQ ID NO: 8) comprendía los 9 nucleótidos 5'-terminales de SEQ ID NO: 2 y el segundo, designado "3' tripsina" (SEQ ID NO: 9) comprendía la secuencia complementaria a los 12 nucleótidos 3'-terminales de SEQ ID NO: 2. Los dos cebadores se diseñaron para que comprendieran sitios de escisión de la endonucleasa de restricción. Por lo tanto, se extendieron el primer y el segundo cebadores e incluían secuencias adyacentes que flanqueaban la secuencia de nucleótidos sintética de SEQ ID NO: 2. "5' tripsina" contenía un sitio EcoRI y un sitio 3' Xba I.

15 Una secuencia de nucleótidos que codificaba una variante, por medio de sustitución de un aminoácido, de la proteína tripsina pancreática porcina madura de tipo salvaje se sintetizó por medio de varias etapas basadas en la PCR.

20 Se llevaron a cabo una primera y una segunda PCR utilizando como molde ADN de doble cadena que comprendía la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 que estaba presente en forma de un inserto en un vector. Las secuencias del vector que flanquean el inserto eran tales que durante la PCR los cebadores "5' tripsina" y "3' tripsina" se emparejaban perfectamente cuando se reasociaban. La primera PCR se efectuó utilizando un par de cebadores que consistían en el cebador "5' tripsina" y un primer oligonucleótido de ADN de cadena sencilla que comprendía la secuencia triplete mutada, es decir variante, con lo que los dos cebadores se reasociaban a cadenas de ADN del molde opuestas. La segunda PCR se efectuó de manera consiguiente, utilizando el cebador "3' tripsina" y un segundo oligonucleótido de ADN de cadena sencilla que era complementario al primero. Como resultado, la primera y segunda PCR generaban dos productos intermedios: una parte 5' y una parte 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de tripsina pancreática porcina recombinante, con lo que la parte 5' portaba la secuencia mutada en su extremo 3' y, viceversa, la parte 3' portaba la secuencia mutada en su extremo 5'.

30 Los dos productos de amplificación intermedios resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos deseados se escindieron y el ADN se aisló a partir de bloques de agarosa utilizando el "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, nº de catálogo 28704).

35 Subsiguientemente, se llevó a cabo una tercera PCR con el fin de fusionar las dos porciones. Para ello, las dos porciones se unieron en una sola PCR y se realizaron cinco ciclos de PCR sin cebadores situados más arriba y situados más abajo adicionales, añadidos. Durante estos ciclos se formaron unos pocos productos de longitud completa, con lo que se calculó la temperatura de reasociación que se utilizaba para la secuencia de solapamiento de la porción 5' y de la porción 3'. Subsiguientemente, se añadieron los cebadores "5' tripsina" y "3' tripsina" y se realizaron 25 ciclos más de PCR, con lo que la temperatura de reasociación utilizada aquí correspondía al cebador añadido con la temperatura de fusión más baja.

40 Subsiguientemente, se insertó un fragmento de ADN de longitud completa, mutado, en un vector de clonación utilizando el "PCR cloning kit – blunt end" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; nº de catálogo 1 939 645). El fragmento de ADN se verificó mediante el análisis de la enzima de restricción y la secuenciación. El fragmento de ADN verificado se escindió luego por medio de escisión con Xho I y Not I y se insertó en vectores de expresión de *Pichia pastoris* que se escindieron con las mismas enzimas de restricción (véanse el Ejemplo 3 y el Ejemplo 5).

45 Ser172Ala: el triplete de bases "TCT" encontrado en SEQ ID NO: 2 en la posición 528-531 fue sustituido con "GCT". Para ello, en una primera PCR el oligonucleótido de ADN "5'-Try-Ser172Ala" (SEQ ID NO: 10) se utilizó como cebador en combinación con "3'-tripsina", y en una segunda PCR "3'-Try-Ser172Ala" (SEQ ID NO: 11) se utilizó como cebador en combinación con "5'-tripsina". Los fragmentos intermedios aislados se utilizaron subsiguientemente para la tercera PCR, con el fin de generar el producto de longitud completa.

50 **Ejemplo 3: Clonación del ADN artificial que codifica un tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante en vectores de expresión derivados de pPICZαA**

El fragmento de ADN que codifica el tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante, el cual se generó a partir de fragmentos de la PCR (véase el Ejemplo 2), se escindió con EcoRI y XbaI (Roche Diagnostics GmbH). El fragmento se aisló utilizando el "QIAquick Gel Extraction Kit" de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El fragmento se ligó en el vector pPICZ α A, fusionando con ello la secuencia de nucleótidos que codifica el tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Antes de la reacción de ligamiento, el vector se escindió de modo similar con EcoRI y XbaI, y se aisló.

5 El proceso de clonación seguido insertaba la secuencia de nucleótidos que codifica el tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante directamente y en marco detrás de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*.

10 La secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína recombinante como se indica en SEQ ID NO: 6 se encontraba bajo el control del promotor AOX-1 de *P. pastoris* (SEQ ID NO.: 7) el cual, p. ej. en *Pichia pastoris*, es inducible por parte de metanol.

15 La construcción se consiguió uniendo en un volumen total de 10 μ l 20 ng de fragmento de vector linearizado (en un volumen de 1 μ l), 100 ng de fragmento de la PCR escindido (en 3 μ l), e incubación durante una noche a 16°C en presencia de T4 ADN ligasa (Roche Diagnostics GmbH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 5 μ l de la preparación de ligamiento se utilizaron subsiguientemente para transformar células XL1Blue de *E. coli* competentes (Stratagene), en un volumen total de 205 μ l. Tras la incubación en hielo durante 30 min, las células se sometieron a choque térmico a 42°C durante 90 s. Subsiguientemente, las células se transfirieron a 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37°C para permitir la expresión de marcadores de selección. Después de ello, partes alícuotas se extendieron en placas LB que contenían 100 μ g/ml de Zeocin y se incubaron durante 15 h a 37°C. Se recogieron clones resistentes, se aislaron plásmidos (Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001) y se sometieron a ensayo por medio de análisis de restricción así como análisis de la secuencia. Se verificó que los clones de la construcción estaban exentos de errores y se seleccionaron artefactos de clonación. El vector de expresión que alberga una tripsina pancreática porcina variante recombinante con el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* se designó pTry-Ser172Ala.

25 **Ejemplo 4: Transformación de *Pichia pastoris* con vectores de expresión pTry-Ser172Ala derivados de pPICZ α A**

30 Las cepas huéspedes utilizadas eran *Pichia pastoris* X-33, GS115, KM71H y SMD1168 (Invitrogen). Las cepas preferidas eran X-33 y KM71H. La transformación se logró en construcciones de expresión integrantes de forma estable en el genoma del organismo huésped. Inicialmente, 5 ml de medio YPD (YPD = yeast peptone dextrose = peptona dextrosa de levaduras; Invitrogen) se inoculó con una colonia de *P. pastoris* y se pre-cultivó en un sacudidor durante una noche a 30°C. Para preparar células competentes para la transformación, se añadieron 100 μ l del pre-cultivo en calidad de inóculo a 200 ml de medio YPD reciente y se desarrollaron hasta que se alcanzó una DO_{600nm} entre 1,3 y 1,5. Las células se centrifugaron a 1.500 x g durante 5 min y se resuspendieron en 200 ml de agua estéril enfriada con hielo (0°C). Las células se centrifugaron de nuevo a 1.500 x g durante 5 min y se resuspendieron en 100 ml de agua estéril enfriada con hielo. Las células se centrifugaron una vez más a 1.500 x g durante 5 min y se resuspendieron en 10 ml de sorbitol 1 M enfriado con hielo (ICN). Las células, preparadas de esta manera, se mantuvieron en hielo y se utilizaron inmediatamente para la transformación.

40 Los vectores de expresión pTry-Ser172Ala derivados de pPICZ α A a utilizar para la transformación se linearizaron utilizando la endonucleasa de restricción Sac I (Roche Diagnostics GmbH), se precipitaron y se resuspendieron en agua. La transformación se consiguió mediante electroporación utilizando un "Gene Pulser II™" (BioRad). Para una estipulación de la transformación, 80 μ l de células de *P. pastoris* en solución de sorbitol 1 M se mezclaron suavemente con 1 μ g de ADN del vector de expresión linearizado y se transfirieron a una cubeta enfriada con hielo que luego se mantuvo en hielo durante 5 min. Subsiguientemente, la cubeta se transfirió al Gene Pulser. Los parámetros de electroporación eran 1 kV, 1 k Ω y 25 μ F. Después de la electroporación, se añadió 1 ml de solución de sorbitol 1 M a la suspensión de células y subsiguientemente se extendió en placas YPDS (YPDS = yeast peptone dextrose sorbitol = peptona dextrosa sorbitol de levaduras; Invitrogen) que contenía 100 μ g/ml de Zeocin® (Invitrogen), rociándose 100-150 μ l de la suspensión de células en una sola placa. Las placas YPDS se incubaron a 30°C durante 2-4 días. Los clones de levaduras se transfirieron a placas de dextrosa mínima con rejilla. Se recogieron colonias de estas placas y se resuspendieron por separado en agua estéril. Las células se digirieron con 17,5 unidades de liticasa (Roche Diagnostics GmbH) durante 1 h a 30°C y después se congelaron durante 10 min a -80°C. Por medio de PCR se verificó la presencia de las casetes de expresión del respectivo vector de expresión pTry-Ser172Ala derivado de pPICZ α A. La expresión "casete de expresión" significa una secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína tripsina pancreática porcina recombinante, operativamente enlazada al promotor AOX1 y al terminador AOX1, con lo que la casete de expresión se deriva del respectivo vector pPICZ α A utilizado para la transformación. En cuanto a vectores que contienen una casete de expresión, el término "vector" y la expresión "casete de expresión" son sinónimos.

Para la caracterización adicional de la expresión de tripsina pancreática porcina variante recombinante se utilizaron clones positivos, es decir clones que se sometieron a ensayo positivamente en cuanto a la presencia de casetes de expresión completas establemente integradas en el genoma. Adicionalmente, se realizaron transformaciones control con la cepa KM71H de *Pichia pastoris* receptora utilizando el vector pPICZ α A original. Los clones positivos se obtuvieron y se verificaron de una manera similar.

Ejemplo 5: Expresión y secreción de tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante

Un conjunto de clones positivos (20-30) transformados con un vector de expresión pPICZ α A-pTrySer172Ala se desarrollaron como cultivos de sacudimiento durante una noche, cada uno en 3 ml de medio BMGY (BMGY = buffered glycerol-complex medium = medio de complejo de glicerol tamponado; Invitrogen). Después de ello, se determinaron los valores de la DO_{600nm} de los cultivos antes de pasarlos a matraces de sacudimiento, cada uno de los cuales contenía 10 ml de medio BMMY (Invitrogen) a pH 3. Como inóculo se utilizaron pre-cultivos para que cada uno diera como resultado una DO_{600nm} de 1. Los cultivos se mantuvieron en un sacudidor a 30°C. En paralelo, se cultivaron clones control positivos bajo las mismas condiciones.

El medio BMMY (BMMY = buffered methanol-complex medium = medio de complejo de metanol tamponado;) comprende metanol (Mallinckrodt Baker B.V.) que es un inductor del promotor AOX-1 que controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica el tripsinógeno pancreático porcino variante recombinante.

Se tomaron muestras de 500 μ l del matraz de sacudimiento a intervalos de 24 h a lo largo de un tiempo total de 72 h. Cuando se separó una parte alícuota de la muestra, el cultivo se alimentó también con 0,5% de metanol. Muestras del medio de crecimiento del sobrenadante se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad enzimática de tripsina.

Ejemplo 6: Análisis de la expresión de tripsina pancreática porcina variante

De las partes alícuotas de la muestra obtenidas en el Ejemplo 5 se determinó primeramente la DO_{600nm}. Subsiguientemente, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se guardó el sobrenadante. Se midió la actividad de tripsina en el sobrenadante sin diluir así como en una dilución 1:10.

Mientras que los clones control transformados con el vector pPICZ α A no conducían a ninguna actividad medible de tripsina en el medio, las cepas de *Pichia* transformadas con los vectores de expresión pPICZ α A-pTrySer172Ala mostraban actividad de tripsina debida a la variante respectiva de tripsina pancreática porcina recombinante segregada en el medio de crecimiento, es decir el medio de cultivo. Por lo tanto, se podía concluir que la expresión de una pre-proteína recombinante, que en este caso comprende el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* permite la secreción de una enzima activa con actividad proteolítica.

Ejemplo 7: Incremento del rendimiento de expresión mediante transformación múltiple y concentración incrementada de Zeocin®

Los clones de levaduras transformados con los vectores de expresión pDNM derivados de pPICZ α A y pPICZA, que se encontró que producían las actividades de tripsina más elevadas en medios sobrenadantes, se sometieron a electroporación repetida utilizando el mismo vector de expresión que previamente. Las condiciones para la electroporación eran como las descritas en el Ejemplo 4, con la excepción de que placas de YPDS contenían Zeocin® a concentraciones incrementadas, es decir entre 1.000 y 2.000 μ g/ml. La concentración del antibiótico se aumentó con el fin de seleccionar transformantes que tuvieran incorporadas en su genoma múltiples copias del vector de expresión respectivo. Clones de levaduras con resistencia incrementada al antibiótico se transfirieron a placas de dextrosa mínima con rejilla. Como ya se ha descrito en el Ejemplo 5, se realizaron pre-cultivos a partir de clones individuales de levaduras y la expresión se midió determinando la actividad enzimática de tripsina segregada en el medio de crecimiento según se describe en el Ejemplo 6. Se encontró que clones individuales producían una cantidad incrementada de la actividad de tripsina. Por término medio, la actividad de la tripsina, medida en el sobrenadante de cepas de *Pichia* y transformada repetidamente con el respectivo vector de expresión pPICZ α A-pTry-Ser172Ala era entre dos a tres veces más alta comparada con las cepas precursoras respectivas que sólo habían sufrido una transformación sencilla.

Ejemplo 8: Purificación de la variante de tripsinógeno pancreático porcino a partir de sobrenadante del cultivo líquido y activación para formar la variante de tripsina

Todo el caldo de fermentación se diluyó en una relación de aproximadamente 1:2 a 1:4 con tampón acetato de amonio (5-20 mM) que contenía cloruro de calcio 5-30 mM, pH 3,5. La variante de tripsinógeno se purificó por medio de cromatografía en lecho expandido (McCormick (1993); documento EP 0 699 687) utilizando un intercambiador de cationes (p. ej. Streamline® SP, XL). La cromatografía se llevó a cabo sin separación previa de

las células de levadura. La purificación adicional se hizo utilizando una columna de lecho empaquetado (p. ej. SP-Sepharose® XL, ff). La activación autocatalítica se inició re-tamponando el pH hasta 7-8 en presencia de CaCl₂ 20 mM. La activación se terminó cambiando el pH de nuevo al intervalo de 2-4. La tripsina purificada se almacenó a pH 1,5-3 con el fin de evitar la autoproteólisis.

5 **Ejemplo 9: Ensayo para determinar la actividad específica de tripsina de tripsina pancreática porcina variante recombinante purificada**

10 La actividad de tripsina se determinó utilizando Chromozym TRY (Roche Diagnostics GmbH) en Tris 100 mM pH 8,0, CaCl₂ 20 mM a 25°C. La medición fotométrica se llevó a cabo a 405 nm. Para discriminar entre la especificidad del sustrato de arginina frente a lisina se utilizaron Chromozym TH (que contiene arginina/Roche Diagnostics GmbH) y Chromozym PL (que contiene lisina/ Roche Diagnostics GmbH).

Ejemplo 10: Escisión de pre-pro-insulina humana

15 Todos los experimentos se efectuaron a 8°C y a un valor del pH de 8,3 (solución tamponada o controlado por dosificación de NaOH) y se realizaron en la escala de 20 mL a la escala de 3,5 L. En algunos experimentos, la pre-pro-insulina se escindió también utilizando tripsina porcina recombinante, nativa, con el fin de comparar directamente las dos enzimas.

La solución de PPI se cargó en un recipiente de reacción con termostato, apropiado, y la reacción se inició mediante la adición de la preparación de enzimas. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo definidos; la reacción enzimática se detuvo inmediatamente al acidificar la solución de la muestra mediante una solución de HCl 1N ó 2N. La concentración de los respectivos productos se determinó mediante HPLC.

20 La Tabla 1 muestra resultados a modo de ejemplo de un experimento.

Escala	Tripsina	Σ pre-Arg-Ins [area%]	Σ Arg-Ins [area%]	des-Thr [area%]	Σcompuestos A0 [area%]	Rendimiento (patrón externo) [%]
3,5 L	S172A nativa	1,4	68,8	7,2	10,7	84,2
		0,9	82,5	3,3	4,1	96,5

Tabla 1: Resultados de la reacción de escisión de pre-pre-insulina (insulina humana) utilizando tripsina porcina recombinante, nativa, y la variante de tripsina S172A (= U/g PPI utilizadas).

25 Como puede verse de la Tabla 1, el uso de la variante de tripsina S172A disminuye la formación de los productos secundarios indeseados, compuestos des-Thr y A0, y, por consiguiente, aumenta la cantidad de Arg-insulinas (Arg-Ins) valiosas y el respectivo rendimiento de la escisión.

La Figura 5 muestra la conversión de la pre-pro-insulina con tripsina porcina recombinante, nativa, la Figura 6 muestra la conversión de PPI con la tripsina variante S172A.

Ejemplo 11: Escisión de pre-pro-insulina glargina

30 Se utilizaron condiciones experimentales del Ejemplo 10. La pre-pro-insulina se escindió también utilizando tripsina porcina recombinante, nativa, con el fin de comparar directamente las dos enzimas.

Método HPLC: según se ha descrito.

La Tabla 2 muestra resultados a modo de ejemplo de los experimentos realizados. Los valores presentados marcan el punto de máxima formación de producto.

35

Escala	Tripsina	pre-insulina glargina [area%]	Insulina glargina [area%]	des-Thr [area%]	Σcompues-tos A0 [area%]	Rendimiento (patrón externo) [%]
1 L	S172A nativa	0,5	51,1	5,6	10,9	58,1
		0,4	55,5	2,6	5,1	62,9

Tabla 2: Resultados de la reacción de escisión de pre-pre-insulina (insulina glargina) utilizando tripsina porcina recombinante, nativa, y la variante de tripsina S172A (200 U/g PPI utilizadas).

- 5 Como puede verse de la Tabla 2, el uso de la variante tripsina S172A disminuye la formación de los productos secundarios indeseados, compuestos des-Thr y A0, y, por consiguiente, aumenta la cantidad de insulina glargina.

Ejemplo 12: Escisión de pre-pro-insulina glulisina

- 10 Se utilizaron condiciones experimentales del Ejemplo 10. La pre-pro-insulina se escindió también utilizando tripsina porcina recombinante, nativa, con el fin de comparar directamente las dos enzimas. La Tabla 3 muestra resultados a modo de ejemplo de los experimentos. Los valores presentados marcan el punto de máxima formación de producto.

Escala	Tripsina	Tripsina Cantidad [U/g de PPI]	Arg-insulina- glulisina [area%]	A0-Arg-insulina- glulisina [area%]	Rendimien-to (patrón externo) [%]
1 L	S172A nativa	250	35,8	4,7	91,6
		250	39,2	1,2	100,0

Tabla 3: Resultados de la reacción de escisión de pre-pre-insulina (insulina glulisina) utilizando tripsina recombinante, nativa, y la variante de tripsina S172A.

- 15 Como puede verse de la Tabla 3, el uso de la variante tripsina S172A disminuye la formación del compuesto A0 indeseado y, por consiguiente, aumenta la cantidad de insulina glulisina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Hoffmann-La Roche AG
Roche Diagnostics GmbH
- <120> Escisión de precursores de insulinas mediante una variante de tripsina
- <130> DE 2005/039G
- 10 <140> 0577086.6
<141> 14-09-2005
- <160> 11
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 223
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> Descripción de la secuencia madura: secuencia de la tripsina pancreática porcina de tipo salvaje sin péptido señal y propéptidos
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 30 <400> 1
Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ala Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Gln Val
1 5 10 15
- 35 Ser Leu Asn Ser Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser
20 25 30
- Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val
35 40 45
- 40 Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe
50 55 60
- Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Thr His Pro Asn Phe Asn Gly Asn Thr
65 70 75 80
- 45 Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Ser Ser Pro Ala Thr Leu
85 90 95
- 50 Asn Ser Arg Val Ala Thr Val Ser Leu Pro Arg Ser Cys Ala Ala Ala
100 105 110
- Gly Thr Glu Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Lys Ser Ser Gly
115 120 125
- 55 Ser Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Gln Cys Leu Lys Ala Pro Val Leu Ser
130 135 140
- 60 Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ser Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gly Asn Met
145 150 155 160

ES 2 370 657 T3

Ile Cys Val Gly Phe Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp
 165 170 175

5 Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Gln Leu Gln Gly Ile Val Ser
 180 185 190

Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Gln Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys
 195 200 205

10 Val Cys Asn Tyr Val Asn Trp Ile Gln Gln Thr Ile Ala Ala Asn
 210 215 220

15
 <210> 2
 <211> 687
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia que codifica el tripsinógeno pancreático porcino sin péptido señal y la parte del propéptido que codifica el sitio de escisión de enteroquinasa

25 <400> 2
 gatgatgatg ataaaattgt tgggtggtat acttgctgct ctaattctat tccatatcaa 60
 gtttcttaa atctggctc tcattttgt ggtggtcct tgattaattc tcaatgggtt 120
 gttctgctg ctcattgta caaatcaaga atccaagta gattgggtga acataatatt 180
 gatgitttg aaggtaatga acaatttatt aatgctgcta aaattattac tcatccaaat 240
 30 ttaaatgga atacttggga taatgatatt atgttgatta aattgtctc tccagctact 300
 ttaaattcaa gagtggctac tgttctttg ccaagatctt gtgctgctgc tggactgaa 360
 tgtttgatt ctggtgggg taatactaaa tcttctggtt ctcttatcc atctttgtg 420
 caatgittga aagctccagt ttgtctgat tcttctgta aatcttcta cccaggtaa 480
 35 atactggta atatgattg tgttggttt ttggaagggt gtaaagattc ttgcaagggt 540
 gattcgggt gccaggtgt ttgtaatggt caattgcaag gtattgttc ttggggttat 600
 ggtgtgctc aaaaaaataa accaggtgtt tacactaaag ttgtaatta tgtaattgg 660
 atcaacaaa ctatgctgc taattag 687

40 <210> 3
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de la tripsina pancreática porcina variante

50 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(223)
 <400> 3

55 Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ala Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Gln Val
 1 5 10 15

Ser Leu Asn Ser Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser
 20 25 30

60 Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val
 35 40 45

ES 2 370 657 T3

Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe
50 55 60

5 Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Thr His Pro Asn Phe Asn Gly Asn Thr
65 70 75 80

Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Ser Ser Pro Ala Thr Leu
85 90 95

10 Asn Ser Arg Val Ala Thr Val Ser Leu Pro Arg Ser Cys Ala Ala Ala
100 105 110

Gly Thr Glu Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Lys Ser Ser Gly
115 120 125

15 Ser Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Gln Cys Leu Lys Ala Pro Val Leu Ser
130 135 140

20 Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ser Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gly Asn Met
145 150 155 160

Ile Cys Val Gly Phe Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Gln Gly Asp
165 170 175

25 Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Gln Leu Gln Gly Ile Val Ser
180 185 190

Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Gln Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys
195 200 205

30 Val Cys Asn Tyr Val Asn Trp Ile Gln Gln Thr Ile Ala Ala Asn
210 215 220

35 <210> 4
<211> 687
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia que codifica la variante de tripsinógeno
pancreático porcino sin péptido señal y la parte del propéptido que codifica el sitio de escisión
de enteroquinasa

45 <400> 4
gatgatgatg ataaaattgt tgggtggtat actgtgctg ctaattctat tccatatcaa 60
gtttcttaa attctggtc tcattttgt ggtggttctt tgattaattc tcaatgggtt 120
gtttctgctg ctcattgta caaatcaaga atccaagtta gattgggtga acataatatt 180
gatgtttgg aaggaatga acaatttatt aatgctgcta aaattattac tcatccaaat 240
50 ttaaattcaa gagttgctac tgtttcttg ccaagatctt gtgctgctgc tggactgaa 360
tgtttgattt ctggtgggg taatactaaa tcttctggtt ctcttatcc atcttggg 420
caatgttga aagctccagt tttgtctgat tcttctgta aatcttcta cccaggcaaa 480
attactgga atatgattg tgttggttt ttggaaggtg gtaaagatgc ttgtcaaggt 540
55 gattctggtg gtccagttgt ttgtaattgt caattgcaag gtattgttc tgggggttat 600
ggtgtgctc aaaaaataa accaggtgt tacactaaag tttgtaatta tgtaattgg 660
attcaacaaa ctattgctgc taattag 687

60 <210> 5
<211> 247
<212> PRT

ES 2 370 657 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos del pre-tripsinógeno porcino maduro

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(16)

10 <223> secuencia de aminoácidos del péptido señal

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (17)..(247)

15 <223> Secuencia de aminoácidos del tripsinógeno porcino

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<300>

20 <400> 5

Ile Pro Asn Thr Phe Val Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ala Ala Val Ala

1 5 10 15

25 Phe Pro Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ala

20 25 30

30 Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Ser His Phe

35 40 45

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His

50 55 60

35 Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Asp

65 70 75 80

40 Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Thr

85 90 95

His Pro Asn Phe Asn Gly Asn Thr Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile

100 105 110

45 Lys Leu Ser Ser Pro Ala Thr Leu Asn Ser Arg Val Ala Thr Val Ser

115 120 125

Leu Pro Arg Ser Cys Ala Ala Ala Gly Thr Glu Cys Leu Ile Ser Gly

130 135 140

50 Trp Gly Asn Thr Lys Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Gln

145 150 155 160

55 Cys Leu Lys Ala Pro Val Leu Ser Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ser Tyr

165 170 175

Pro Gly Gln Ile Thr Gly Asn Met Ile Cys Val Gly Phe Leu Glu Gly

180 185 190

60 Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn

195 200 205

ES 2 370 657 T3

Gly Gln Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Gln Lys
 210 215 220

5 Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Asn Tyr Val Asn Trp Ile
 225 230 235 240

Gln Gln Thr Ile Ala Ala Asn
 245

10 <210> 6
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> Pichia pastoris

15 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la variante de pre-tripsinógeno pancreático porcino

20 <220>
 <221> no segura
 <222> (1)..(267)
 <223> secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal

25 <220>
 <221> no segura
 <222> (268)..(960)
 <223> que codifica el tripsinógeno pancreático porcino variante

30 <400> 6
 atgagatttc ctcaatttt tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggtgaagc tgcacatcgt 120
 tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttcaa cagcaciaaat 180
 aacggggtat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 35 tctctcga aaagagagggc tgaagctgaa ttctgatgat atgataaaa tgttgggtgt 300
 tatactgtg ctgctaattc tattccatat caagtttct taaattctgg ttctcatttt 360
 tgttgggtgt ctttgattaa ttctcaatgg gttgttctg ctgctcattg ttacaaatca 420
 agaatccaag ttgattggg tgaacataat attgatgtt tggaggtaa tgaacaattt 480
 attaagtctg ctaaaattat tactcatcca aattttaatg gtaatacttt ggataatgat 540
 40 attatgtga ttaaattgct ttctccagct actttaaatt caagagtgc tactgtttct 600
 ttgccaagat cttgtgctgc tgctgttact gaatgtttga ttctggttg gggaataact 660
 aaatctctg gttcttcta tccatctttg ttgcaatgtt tgaagctcc agttttgtct 720
 gatttctct gtaaatctc ttaccaggt caaattactg gtaatatgat ttgttgggt 780
 45 ttttggaaag gtgtaaaaga tgcitgtcaa ggtgattctg ggtgtccagt tgtttgtaat 840
 ggcaattgc aaggtattg ttctgggggt tatgggttg ctcaaaaaaa taaaccaggt 900
 gtttacta aagttgtaa ttatgtaat tggattcaac aaactattgc tgctaattaa 960

50 <210> 7
 <211> 938
 <212> ADN
 <213> Pichia pastoris

55 <220>
 <223> Secuencia de nucleotides del promotor AOX1 de Pichia pastoris

60 <400> 7
 agatctaaca tcaaagacg aaaggttga tgaaccttt ttgcatccg acatccacag 60
 gtccattctc acacataagt gccaaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
 tgcaaacgca ggacatccac tctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180
 agcccagtta ttgggctga ttggagctcg ctattccaa ttcttctat taggctacta 240
 acaccatgac ttattagcc tgtctatcct ggccccctg gcgaggttca tgtttgtta 300
 ttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360

ES 2 370 657 T3

agtgtggggt caaatagttt catgttcccc aatggccca aaactgacag tttaaacgct 420
 gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatcaa gatgaactaa gtttggtcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaactcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 5 ctgtttggt atgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgt tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660
 ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgctcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgtct aaccctact tgacagcaat 780
 atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aaccttttt tttatcatca ttattagctt 840
 10 actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagctttg attttaacga cttttaacga 900
 caactgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaaa 938

15 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 5´-tripsina

<400> 8
 gctgaagctg aattcgatga tgatg 25

25 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 3´-tripsina

35 <400> 9
 gttttgttc tagactaatt agcagc 26

40 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 5´-Try-Ser172Ala

45 <400> 10
 ggtgtaaag atgctgtca aggtg 25

50 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 3´-Try-Ser172Ala

<400> 11
 cacctgaca ggcattctta ccacc 25

60

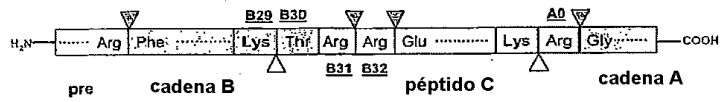
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina, en el que
 - (a) una pre-pro-insulina, un análogo de pre-pro-insulina o un derivado de pre-pro-insulina se escinde con tripsina porcina Ser172Ala caracterizada por la SEQ ID NO. 3,
 - 5 (b) los productos de la escisión resultantes se separan y
 - (aa) si uno de los productos de la escisión resultantes es un análogo de insulina o un derivado de insulina, se obtiene este análogo de insulina o derivado de insulina, o
 - (cc) siendo esos productos de la escisión precursores de insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina se procesan adicionalmente, y la insulina, el análogo de insulina o el derivado de insulina que resultan de dicho procesamiento adicional se separa y se obtiene.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la insulina es insulina humana.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de insulina se selecciona de un grupo que comprende insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28 Asp, insulina humana en la que prolina en la posición B28 ha sido sustituida con Asp, Lys, Leu, Val o Ala y en que en la posición B29 Lys puede estar sustituida con Pro; insulina humana AlaB26; insulina humana des(B28-B30); insulina humana des(B27) e insulina humana des(B30).
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de insulina es insulina glulisina.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de insulina es insulina glargina.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado de insulina se selecciona del grupo que comprende insulina humana B29-N-miristoil-des(B30), insulina humana B29-N-palmitoil-des(B30), insulina humana B29-N-miristoil, insulina humana B29-N-palmitoil, insulina humana B28-N-miristoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B28-N-palmitoil-Lys^{B28}Pro^{B29}, insulina humana B30-N-miristoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B30-N-palmitoil-Thr^{B29}Lys^{B30}, insulina humana B29-N-(N-palmitoil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(N-litocolil-Y-glutamil)-des(B30), insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoil)-des(B30) e insulina humana B29-N-(ω-carboxiheptadecanoilo).
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, en el que el procesamiento adicional de los productos de la escisión que son precursores de insulina, un análogo de insulina o un derivado de insulina comprende una escisión de dichos productos con carboxipeptidasa B.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la escisión con tripsina porcina Ser172Ala se efectúa a un valor del pH en el intervalo de 7,5 a 9,5; una temperatura entre 1°C y 30°C; y la reacción enzimática se detiene al acidificar la muestra.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la escisión se efectúa a un valor del pH de 8,3; una temperatura entre 8 y 12 °C y la acidificación se lleva a cabo añadiendo solución de HCl 1N ó 2N.
10. Tripsina porcina Ser172Ala, caracterizada por la secuencia SEQ ID. NO: 3.
- 35 11. ADN que codifica tripsina porcina Ser172Ala caracterizada por la secuencia SEQ ID. NO: 3.
12. ADN de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por la secuencia SEQ ID. NO: 4.
13. ADN que codifica tripsinógeno porcino Ser196Ala caracterizada por la secuencia SEQ ID. NO: 6.
14. Un vector que comprende un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 ó 13.
- 40 15. Un método para producir tripsina porcina Ser172Ala caracterizada por la secuencia SEQ ID. NO: 3, que comprende las etapas de
 - (a) proporcionar un vector de acuerdo con la reivindicación 14,
 - (b) transformar con el vector una cepa huésped microbiana,

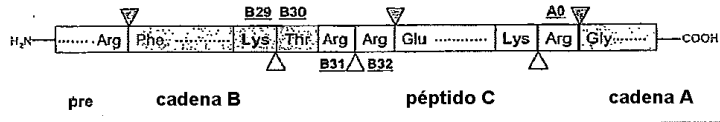
- 5
- (c) cultivar la cepa huésped microbiana transformada en un medio de crecimiento que contiene nutrientes, con lo que la cepa huésped microbiana expresa la tripsina porcina Ser172Ala o el tripsinógeno porcino Ser196Ala,
 - (d) en el caso de que el producto de expresión de (c) sea tripsinógeno porcino Ser196Ala, conversión en tripsina porcina Ser172Ala madura, y
 - (e) purificar la tripsina porcina Ser172Ala a partir de la cepa huésped microbiana y/o el medio de crecimiento.
- 10
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la cepa huésped microbiana es una cepa de levadura metilotrófica seleccionada de un grupo que comprende especies de *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la cepa huésped microbiana se selecciona de un grupo que comprende *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y *Torulopsis glabrata*.

Fig. 1:

Insulina humana



Insulina glargina



Insulina glulisina

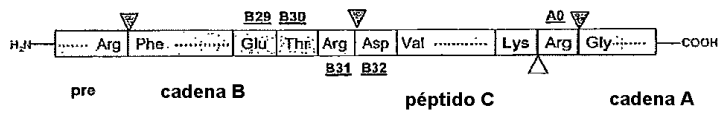


Fig. 2:

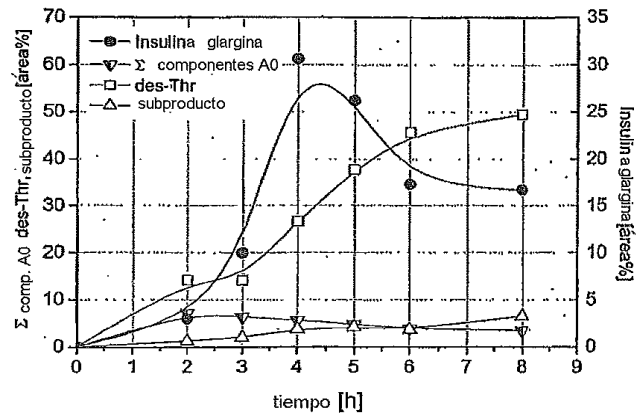


Fig.3

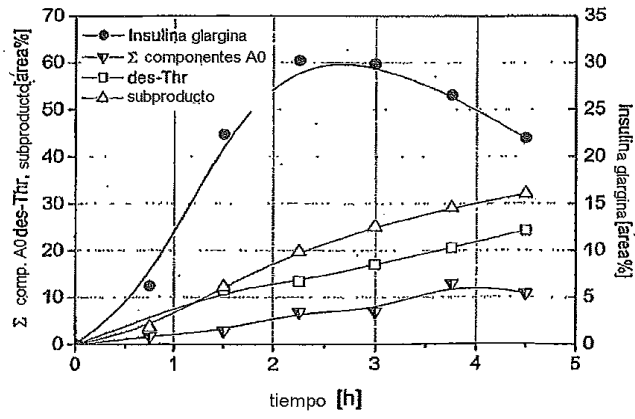


Fig. 4:

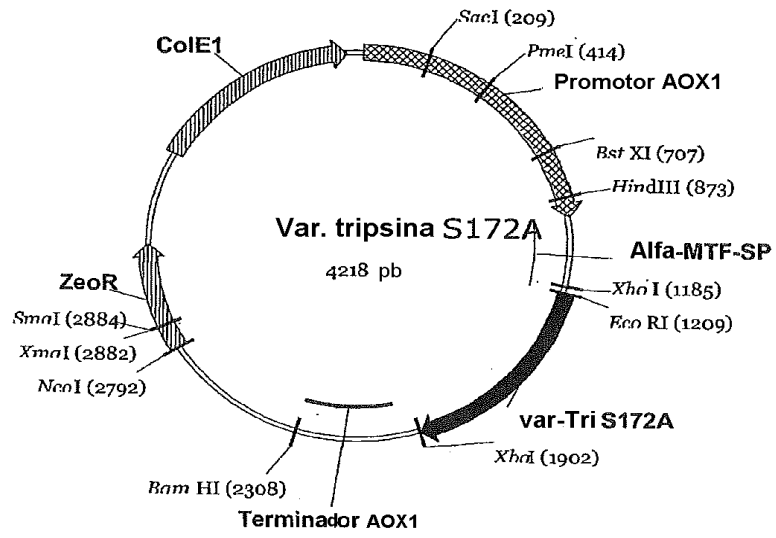


Fig. 5:

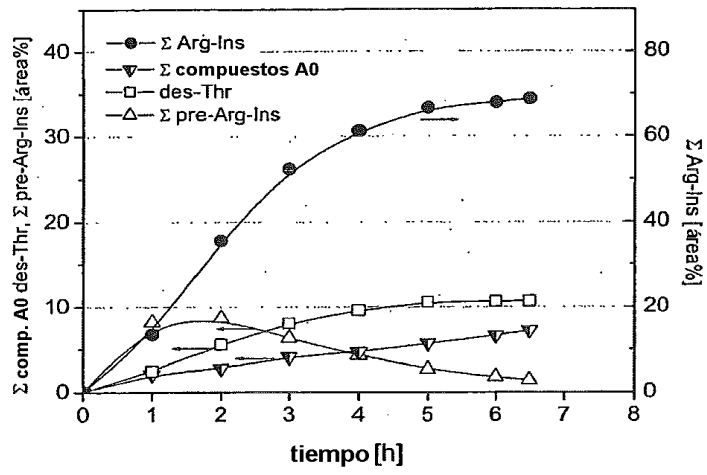


Fig. 6:

