

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 463**

51 Int. Cl.:

C07K 14/585 (2006.01)

C07K 14/63 (2006.01)

C07K 14/695 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2004 E 04773628 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1674567**

54 Título: **Método de escisión de polipéptidos usando un mutante de la proteasa OmpT**

30 Prioridad:

30.09.2003 JP 2003342183

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

19.03.2013

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo, JP**

72 Inventor/es:

**OKUNO, KAZUAKI y
YABUTA, MASAYUKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 463 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de escisión de polipéptidos usando un mutante de la proteasa OmpT.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para escindir directamente un péptido, proteína o su derivado fisiológicamente activo de una proteína de fusión utilizando variantes de proteasa OmpT de *E. coli*. Más específicamente, se refiere a un método para la escisión de una proteína de fusión usando proteasa OmpT madura de *E. coli* en el que se sitúa un aminoácido básico en la posición P3, la posición P4 y la posición P5 del sitio de escisión para aumentar la eficacia de escisión en el enlace peptídico entre las posiciones P1 y P1' del sitio de escisión, y adicionalmente a un método de uso de una variante de proteasa OmpT que tiene modificada su especificidad de sustrato por la posición P1' mediante la sustitución del aminoácido 97 desde el extremo N para una liberación y producción eficaz de péptidos, proteínas y sus derivados fisiológicamente activos a partir de proteínas de fusión incluso cuando el aminoácido en el sitio P1' sea un aminoácido distinto de arginina o lisina.

Antecedentes de la técnica

15 La proteasa OmpT de *E. coli* está presente en las fracciones de membrana externa de *E. coli* y esta proteasa escinde selectivamente principalmente los enlaces peptídicos entre pares de aminoácidos básicos. Se encuentran también proteínas que tienen secuencias aminoacídicas homólogas con la proteasa OmpT de *E. coli*, y que tienen o se cree que tienen actividad proteasa, en bacterias intestinales tales como *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella*, y este grupo de proteínas es conocido como la familia de la ompTina.

20 La proteasa OmpT de *E. coli* tiene un peso molecular de aproximadamente 33.500. Sugimura *et al.* han examinado la especificidad de sustrato de la proteasa OmpT y han reseñado que la enzima escinde específicamente los enlaces peptídicos centrales entre los pares de aminoácidos básicos arginina-arginina, lisina-lisina, arginina-lisina y lisina-arginina (Sugimura, K. y Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988).

25 Sin embargo, la enzima no escinde todos los pares de aminoácidos básicos, ya que es altamente específica. Por ejemplo, el interferón γ humano contiene 10 pares de aminoácidos básicos, pero solo se escinden dos de ellos (Sugimura, K. y Higashi, N. J. Bacteriol. 170: 3650-3654, 1988). Esto se atribuye a la influencia de la estructura tridimensional del sustrato interferón γ humano y a las secuencias aminoacídicas de los sitios que se cree que reconoce la enzima, que son adyacentes a los pares de aminoácidos básicos.

30 Las posiciones aminoacídicas de los sustratos designados a lo largo de la presente memoria descriptiva se asignan según el método de notación de Schechter y Berger (Schechter, I. y Berger, A. Biochem. Biophys. Research. Commun. 27: 157-162, 1967). Es decir, el enlace peptídico entre la posición P1 y la posición P1' de Pn...P2-P1-P1'-P2'... Pn' es el sitio de escisión, y los aminoácidos están representados por sus abreviaturas de una letra o tres letras estándares, indicando ↓ el sitio de escisión.

35 Por ejemplo, si la escisión es entre lisina y arginina de la secuencia aminoacídica -leucina-tirosina-lisina-arginina-histidina- (-Leu-Tyr-Lys↓Arg-His-), en posición P3 está leucina, en posición P2 está tirosina, en posición P1 está lisina, en posición P1' está arginina y en posición P2' está histidina.

También, a menos que se especifique otra cosa, estas referencias se usarán como las posiciones aminoacídicas correspondientes a la secuencia original incluso cuando se haya introducido una sustitución aminoacídica en el sitio de escisión o en su secuencia aminoacídica circundante tal que no sea ya escindible o resulte un nuevo sitio de escisión.

40 Se han descubierto sitios de escisión de proteasa OmpT con secuencias aminoacídicas distintas de pares de aminoácidos básicos y Dekker *et al.*, usando sustratos con sustituciones aminoacídicas introducidas en un sustrato de proteasa OmpT que comprende la secuencia aminoacídica Ala-Arg-Arg-Ala (P2-P1↓P1'-P2'), han reseñado que la proteasa OmpT exhibe una alta especificidad por los aminoácidos básicos arginina y lisina como aminoácido en posición P1 del sitio de escisión, pero es menos rigurosa con respecto al aminoácido en la posición P1' (Dekker, N. *et al.* Biochemistry 40: 1694-1701, 2001).

45 Además, los presentes inventores, usando como sustrato una proteína de fusión capaz de escindirse por la enzima en condiciones desnaturalizantes de polipéptidos en presencia de urea, en la que se introduce una sustitución aminoacídica en la posición P1' de la proteína de fusión, han descubierto que aparece escisión cuando la posición aminoacídica P1' es un aminoácido distinto de ácido aspártico, ácido glutámico o prolina (Okuno, K. *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 127-134, 2002, solicitud de patente japonesa nº 2000-602803). Sin embargo, la eficacia de escisión en estos casos es todavía menor que cuando el residuo aminoacídico en la posición P1' es arginina o lisina.

50 En cuanto a la especificidad con respecto a las secuencias adyacentes al sitio de escisión, se ha demostrado que no ocurre escisión cuando está presente un aminoácido ácido en la posición P2 o P2' (Dekker, N. *et al.* Biochemistry 40: 1694-1701, 2001).

Los presentes inventores han reseñado también que la eficacia de escisión aumenta cuando está presente arginina o lisina como aminoácido básico en la posición P4 o la posición P6, mientras que a la inversa se reduce en el caso de un aminoácido ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico (Okuno, K. *et al.* Biotechnol. Appl. Biochem. 36: 7784, 2002, solicitud de patente japonesa 2000-602803).

5 Aunque no se ha establecido la especificidad por otras secuencias adyacentes al sitio de escisión, el hecho de que la proteasa OmpT escinda protaminas, que son péptidos antimicrobianos altamente básicos (Stumpe, S. *et al.* J. Bacteriol. 180: 4002-4006, 1998), y que se encuentren muchos aminoácidos básicos en el dominio extracelular de la proteasa OmpT implicado en la actividad proteasa (Vandeputte-Rutten, L. *et al.* EMBO J. 20: 5033-5039, 2001), sugiere que los efectos de carga son importantes para la interacción entre la proteasa OmpT y su sustrato.

10 Respecto a las aplicaciones de la proteasa OmpT, la alta especificidad del sitio de escisión y el hecho de que la proteasa esté presente en la membrana externa de *E. coli* significa que la proteasa puede usarse como enzima procesadora para liberar polipéptidos diana a partir de proteínas de fusión creadas mediante técnicas de recombinación génica.

15 Hanke *et al.*, al llevar a cabo la secreción de colesterol esterasa usando *E. coli*, la fusionaron con la proteína hemolisina A de *E. coli*, secretaron la proteína de fusión extracelularmente y permitieron a la proteasa OmpT de la membrana externa actuar sobre ella, obteniendo así exitosamente colesterol esterasa activa a partir de la proteína de fusión. Aquí, se añadió un ligador con una secuencia de arginina-lisina para la escisión de la secuencia con proteasa OmpT (Hanke, C. *et al.* Mol. General. Genet. 233: 42-48, 1992).

20 Los presentes inventores han descubierto que la proteasa OmpT es resistente a agentes desnaturizantes, y han utilizado esta propiedad para mostrar que las proteínas de fusión expresadas como cuerpos de inclusión pueden escindirse en presencia de agentes desnaturizantes. Específicamente, se expresó una proteína de fusión derivada de proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* como cuerpo de inclusión en un sistema de expresión de *E. coli*, se solubilizó con urea y se hizo actuar entonces la proteasa OmpT en presencia de urea, lo que daba como resultado la liberación de la porción de derivado de proteasa V8 a partir de la proteína de fusión, y el posterior repliegamiento permitía la producción exitosa del derivado de proteasa V8 con actividad enzimática (Yabuta, M. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 118-125, 1995).

25 Normalmente, la liberación de un polipéptido o proteína diana a partir de una proteína de fusión se logra usando una enzima con una alta especificidad de secuencia aminoacídica como enzima procesadora. Las proteasas conocidas usadas en dichos casos incluyen factor Xa, trombina y enterocinasa, pero debido a que estas enzimas son enzimas derivadas de mamíferos y por lo tanto de suministro escaso y costosas, no son adecuadas para el procesamiento masivo industrial de péptidos y proteínas mediante métodos de proteínas de fusión. Además, cuando el polipéptido o proteína diana se va a usar como producto farmacéutico, es también necesario considerar la contaminación vírica originaria de la fuente enzimática, así como la contaminación por proteínas priónicas alteradas que son factores causantes de encefalopatía esponjiforme bovina.

35 Puesto que la proteasa OmpT deriva de *E. coli*, su uso como enzima procesadora se prefiere claramente frente a las enzimas anteriormente mencionadas en términos de volumen de suministro, coste y seguridad. Además, debido a que la proteasa OmpT está también presente en cuerpos de inclusión, puede actuar simplemente lisando la proteína de fusión con un agente desnaturizante tal como urea incluso cuando la proteína de fusión se expresa como cuerpo de inclusión. Además, la proteasa OmpT está también presente en la membrana externa de *E. coli* y por lo tanto la reacción de la proteasa OmpT puede llevarse a cabo mediante la adición de las células mismas al sistema de reacción (Grodberg, J. y Dunn, J. J. J. Bacteriol. 170: 1245-1253, 1988).

40 La mayoría de proteasas usadas para procesar proteínas de fusión producidas por *E. coli* para obtener polipéptidos diana en la producción de péptidos industriales, tal como la producción de productos farmacéuticos, no derivan de *E. coli* y por lo tanto deben purificarse para uso. Por tanto, podría proporcionarse una mejora importante en el coste de producción de polipéptidos si pudiera usarse la proteasa OmpT como proteasa procesadora mediante la simple adición de la fracción de membrana externa o de lisis de cuerpo de inclusión de las células de *E. coli* mismas, sin requerir purificación. Sin embargo, el procesamiento de las proteínas de fusión usando proteasa OmpT de *E. coli* convencional, con la excepción de unos pocos casos, ha sido limitado porque solo se liberan los polipéptidos cuyos aminoácidos N-terminales son lisina o arginina.

45 A pesar de la utilidad de la proteasa OmpT, su conocimiento para el uso de la proteasa OmpT como enzima de escisión para proteínas de fusión ha estado limitado, antes de la presente invención, con respecto a cómo debería diseñarse la secuencia del sitio de escisión y sus aminoácidos adyacentes para conseguir una escisión específica y eficaz en el sitio pretendido. Por consiguiente, los tipos de aminoácidos N-terminales para polipéptidos diana escindibles eficazmente han estado limitados. Esta ha sido la causa de problemas que incluyen restricciones de los tipos de polipéptidos diana que pueden obtenerse y dan como resultado, por ejemplo, la incapacidad de lograr una escisión eficaz incluso cuando es posible la escisión.

Documento de patente 1: Solicitud de patente japonesa nº 2000-602803.

Documento no de patente 1: Sugimura, K. y Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988.

Documento no de patente 2: Sugimura, K. y Higashi, N. J. Bacteriol. 170: 3650-3654, 1988.

Documento no de patente 3: Schechter, I. y Berger, A. Biochem. Biophys. Research. Commun. 27: 157-162, 1967.

Documento no de patente 4: Dekker, N. *et al.* Biochemistry 40: 1694-1701, 2001.

Documento no de patente 5: Okuno, K. *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 127-134, 2002.

5 Documento no de patente 6: Okuno, K. *et al.* Biotechnol. Appl. Biochem. 36: 77-84, 2002.

Documento no de patente 7: Stumpe, S. *et al.* J. Bacteriol. 180: 4002-4006, 1998.

Documento no de patente 8: Vandeputte-Rutten, L. *et al.* EMBO J. 20: 5033-5039, 2001.

Documento no de patente 9: Hanke, C. *et al.* Mol. General. Genet. 233: 42-48, 1992.

Documento no de patente 10: Yabuta, M. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 118-125, 1995.

10 Documento no de patente 11: Grodberg, J. y Dunn, J. J. J. Bacteriol. 170: 1245-1253, 1988.

Divulgación de la invención

Es un objeto de la presente invención superar los problemas mencionados anteriormente proporcionando un método para liberar eficaz y específicamente cualquier tipo de polipéptido diana a partir de una proteína de fusión, utilizando variantes de proteasa OmpT como enzima procesadora y, específicamente, para escindir eficazmente solo el enlace sencillo de P1-P1' de una proteína de fusión en la que el aminoácido N-terminal del polipéptido diana es el residuo aminoacídico en posición P1'.

Los presentes inventores examinaron adicionalmente el sitio de escisión de proteasa OmpT y su secuencia aminoacídica adyacente, y consideraron que si pudiera idearse un método de escisión o de reconocimiento/escisión de secuencia novedoso, podrían superarse las restricciones descritas anteriormente y la enzima sería aún más útil como enzima procesadora para proteínas de fusión. Además, se especuló que introducir una mutación dirigida a sitio en la proteasa OmpT misma, para producir una variante de proteasa OmpT que tuviera una especificidad de sustrato diferente que el tipo silvestre, podría ser de gran utilidad.

Por tanto, dado que la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión es importante para el reconocimiento y escisión de sustrato por la proteasa OmpT, los presentes inventores utilizaron el sitio de escisión conocido e investigaron el sitio de escisión y su secuencia aminoacídica adyacente para crear nuevas especificidades de sustrato, y llevaron a cabo diligentemente entonces investigaciones sobre su aplicación en la escisión de proteínas de fusión.

Según la invención, "proteasa OmpT" designa la proteasa OmpT madura de *E. coli* después de la retirada del péptido señal, o una proteína distinta de la proteasa OmpT que tiene actividad proteasa OmpT y que se selecciona de las proteasas de tipo OmpT (1) activador de plasminógeno de *Yersinia pestis*, (2) proteína E de *Salmonella typhimurium*, (3) SopA de *Escherichia coli* y (4) de *Shigella flexneri*.

Según la invención, "variante aminoacídica 97 de proteasa OmpT" designa una variante de proteasa OmpT que tiene el ácido aspártico en la posición 97 (Asp⁹⁷) de la proteasa OmpT reemplazado por un aminoácido diferente, o una variante de la proteasa de tipo OmpT anteriormente mencionada que tiene un aminoácido equivalente al aminoácido 97 desde el extremo N de la proteasa OmpT reemplazado (variante de aminoácido equivalente al 97 de proteasa de tipo OmpT).

Los aminoácidos que sustituyen el ácido aspártico 97 de la proteasa OmpT son leucina, metionina e histidina. Las variantes de aminoácido correspondientes al 97 de la proteasa de tipo OmpT son variantes de las proteasas de tipo OmpT anteriormente mencionadas en las que el ácido aspártico en posición 117 para (1) activador de plasminógeno de *Yersinia pestis* (contado como residuo aminoacídico del extremo N de la secuencia aminoacídica completa incluyendo el péptido señal; para OmpT también, el aminoácido 97 contado como el número de residuos aminoacídicos incluyendo el péptido señal está en posición 117), el ácido aspártico en posición 134 para (2) proteína E de *Salmonella typhimurium*, el ácido aspártico en posición 117 para (3) OmpP de *Escherichia coli* y el ácido aspártico en posición 117 para (4) SopA de *Shigella flexneri* se reemplazan por leucina, metionina o histidina.

El término "péptido diana" según la invención se usa no solo con respecto al péptido que se va a obtener finalmente, sino que también incluye cualquier intermedio de producción ("péptido precursor") que, después de escisión de la proteína de fusión por proteasa OmpT o similar, se somete a una reacción de modificación o reacción de escisión posterior.

El término "péptido protector" según la invención se usa para designar un péptido que forma una proteína de fusión con el péptido diana a través de un péptido ligador, e incluye el péptido ligador.

El término "sitio de escisión deseado" según la invención designa cualquier sitio en el polipéptido, un sitio entre el extremo C del péptido ligador de la proteína de fusión compuesta por la proteína diana fusionada con el péptido protegido a través del péptido ligador y el extremo N del péptido diana, o cualquier sitio en el péptido ligador.

La esencia principal de la presente divulgación se refiere a los siguientes aspectos (1) a (4):

5 (1) Un método de escisión de polipéptido caracterizado porque hay arginina o lisina en la posición P1 de un sitio de escisión deseado en un polipéptido, hay un aminoácido distinto de ácido aspártico, ácido glutámico o prolina en la posición P1', están situados un solo aminoácido básico o dos o tres aminoácidos básicos consecutivos en cualquier sitio de la secuencia aminoacídica desde la posición P10 a la posición P3 o desde la posición P3' hasta la posición P5' (con la condición de que no esté situado un solo aminoácido básico en la posición P6 o P4), y porque la proteasa OmpT se usa para escindir el sitio de escisión deseado en el polipéptido, y un método para producir un péptido diana caracterizado porque se obtiene el péptido diana a partir de una proteína de fusión usando el método de escisión.

(2) Un método de escisión de polipéptido caracterizado porque se usa una variante del aminoácido 97 de proteasa OmpT para escindir un sitio de escisión deseado en un polipéptido, y un método para producir un péptido diana caracterizado por obtener el péptido diana a partir de una proteína de fusión usando el método de escisión.

15 (3) Un método según (2) anteriormente, en el que hay arginina o lisina en la posición P1 de un sitio de escisión deseado en un polipéptido, hay un aminoácido distinto de arginina o lisina en la posición P1' y están situados un solo aminoácido básico o dos o tres aminoácidos básicos consecutivos en cualquier sitio de la secuencia aminoacídica desde la posición P10 a la posición P3 o desde la posición P3' a la posición P5'.

20 (4) Un método de escisión de polipéptido en el que se usa una proteasa OmpT o una variante del aminoácido 97 de proteasa OmpT para escindir un sitio de escisión deseado en un polipéptido, estando caracterizado el método de escisión de polipéptido porque cuando está presente en el polipéptido un sitio que no se desea escindir por la proteasa, se inhibe la escisión en ese sitio situando un aminoácido ácido en la posición P3 del sitio, y un método para producir un péptido diana caracterizado porque se obtiene el péptido diana a partir de una proteína de fusión usando el método de escisión.

25 El aspecto (1) anterior está basado en el nuevo conocimiento de que la eficacia de escisión aumenta al sustituir aminoácidos básicos por aminoácidos ácidos desde la posición P10 a la posición P3 (excluyendo los casos en que solo se reemplaza la posición P6 o P4 por un aminoácido básico) y lo más preferiblemente desde la posición P5 a la posición P3 del sitio de escisión de proteasa OmpT. Sin embargo, debido a la naturaleza de OmpT de escindir fácilmente enlaces peptídicos entre aminoácidos básicos consecutivos, situar aminoácidos básicos consecutivamente en las posiciones P5 a P3 da como resultado la escisión de los enlaces peptídicos en esos sitios por la OmpT.

30 No obstante, al utilizar la propiedad conocida mediante la cual la eficacia de escisión de la OmpT por tres residuos de arginina consecutivos es menor que por dos residuos de arginina consecutivos, fue posible inhibir la escisión entre residuos de arginina de las posiciones P5 a P3 al situar tres residuos de arginina consecutivos de las posiciones P5 a P3. Es decir, era así posible promover la escisión en el sitio deseado (escisión entre los aminoácidos en posición P1 y posición P1') inhibiendo la escisión en sitios indeseables (escisión entre los aminoácidos de las posiciones P5 a P3).

35 Por tanto, se descubrió que puede conseguirse una escisión extremadamente eficaz con proteasa OmpT no solo cuando hay arginina o lisina en la posición P1' del sitio de escisión deseado del polipéptido, como es conocido en la técnica anterior, sino también cuando hay otro aminoácido distinto de ácido aspártico, ácido glutámico o prolina, al diseñar el polipéptido deseado para que contenga una secuencia aminoacídica que tenga aminoácidos básicos (preferiblemente arginina) situados en las posiciones P3, P4 y P5 del sitio de escisión deseado.

40 Este método es particularmente conveniente cuando se produce una proteína de fusión que contiene un polipéptido diana en un hospedador *E. coli* y se usa una proteasa OmpT que es natural de *E. coli* o introducida por ingeniería genética para separar el polipéptido diana de la proteína de fusión, en el que los aminoácidos N-terminales situados en el extremo C-terminal de la posición P1' del sitio de escisión deseado son aminoácidos distintos de ácido aspártico, ácido glutámico o prolina.

45 El descubrimiento de que la sustitución por aminoácidos específicos del aminoácido 97 desde el extremo N de la proteasa OmpT permite la escisión real de sitios de escisión que no pueden escindirse con proteasa OmpT, según los aspectos (2) y (3) anteriores, es extremadamente útil ya que permite la producción de péptidos diana con una variedad de selección en los tipos de aminoácidos N-terminales de los péptidos. En particular, al diseñar la secuencia ligadora de una proteína de fusión para que sea el péptido diana -Arg-Arg-Arg-Ala-Arg para la producción de un péptido diana usando la proteína de fusión, y utilizar como proteasa procesadora una variante de proteasa que tiene lo más preferiblemente leucina, metionina o histidina sustituyendo al ácido aspártico 97 desde el extremo N de la proteasa OmpT, es posible liberar eficaz y específicamente incluso polipéptidos en los que el aminoácido N-terminal es distinto de lisina o arginina.

55 Aunque la escisión de proteínas de fusión se lleva a cabo usando una variante de proteasa OmpT de *E. coli* a lo largo de los ejemplos de la presente solicitud, es también perfectamente posible escindir una proteína de fusión usando una enzima con actividad proteasa OmpT distinta de la proteasa OmpT o una variante de la enzima en la que el aminoácido

correspondiente al aminoácido 97 desde el extremo N de la proteasa OmpT está reemplazado en su secuencia aminoacídica.

5 Con respecto a (4) anteriormente, se ha descubierto que cuando un polipéptido o proteína de fusión contiene un sitio que no se desea escindir por proteasa OmpT o su variante, se inhibe la escisión en ese sitio situando un aminoácido ácido en la posición P3 del sitio. Este descubrimiento es útil para diseñar proteínas de fusión, particularmente cuando se van a obtener péptidos diana a partir de las proteínas de fusión, y permite una producción altamente eficaz de dichos péptidos diana.

Más específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

- (1) un método de escisión de polipéptido y
- 10 (2) un método de producción de un péptido diana, ambos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

15 La Fig. 1 es un diagrama que muestra las estructuras de las proteínas de fusión PRR y PRX. Se muestra la posición de cada aminoácido en la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión PRR, y los números debajo representan los números de la secuencia aminoacídica desde el extremo N de PRR. β -gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos del extremo N de β -galactosidasa de *E. coli*, GLP-1(7-37) representa el péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 153 (arginina). El sitio de escisión de proteasa OmpT en la proteína de fusión PRR está indicado por una cuña negra. La proteína de fusión PRX es una proteína de fusión en la que la arginina en posición 141 de PRR está reemplazada por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos diferentes.

20 La Fig. 2 es un diagrama que muestra la estructura de la proteína de fusión PAn. Se muestra la posición de cada aminoácido en la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión PA, y los números debajo representan los números de la secuencia aminoacídica desde el extremo N de PA. β -gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β -galactosidasa de *E. coli*, GLP-1(7-37) representa el péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 153 (arginina). El sitio de escisión de la proteasa OmpT en la proteína de fusión PA está indicado por una cuña negra. Los residuos de arginina introducidos mediante sustitución aminoacídica en la proteína de fusión PAn se indican en cursiva y negrita. El sitio de escisión de la proteasa OmpT en PAn se indica por \downarrow . A la derecha, se muestran las eficacias de escisión para cada proteína de fusión, siendo la eficacia de escisión de la proteína de fusión PA de 100%. La letra "a" incluye la eficacia de escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰. La letra "b" incluye la eficacia de escisión en Arg¹⁴¹-Arg¹⁴². La letra "c" incluye la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴.

30 La Fig. 3 muestra las estructuras de las proteínas de fusión PA1A3', PA1'A3', PA23', PA323' y PA2'3'. Se muestra la posición de cada aminoácido en la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión PA3', y los números debajo representan los números de la secuencia aminoacídica desde el extremo N de PA3'. β -gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β -galactosidasa de *E. coli*, GLP-1(7-37) representa el péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 153 (arginina). Los residuos de arginina se muestran en negrita. Los sitios de escisión de proteasa OmpT de la proteína de fusión PA3' se representan por triángulos blancos (eficacia de escisión: 73%) y triángulos negros (eficacia de escisión: 220%). Los residuos introducidos por sustitución aminoacídica en PA3' para las proteínas de fusión PA1A3', PA1'A3', PA23', PA323' y PA2'3' se muestran en cursiva y el sitio de escisión de proteasa OmpT se indica por \downarrow . A la derecha, se muestran las eficacias de escisión para el sitio Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ (círculos negros) y el sitio Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ (círculos blancos) en cada proteína de fusión, siendo la eficacia de escisión de la proteína de fusión PA de 100%. ND simboliza "no detectado". La letra "a" representa la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹. La letra "b" la eficacia de escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰. La letra "c" incluye la eficacia de escisión en Arg¹⁴²-Ala¹⁴³.

45 La Fig. 4 muestra las estructuras de las proteínas de fusión PA3D23', PA4D23' y PA5D23'. Se muestra la posición de cada aminoácido en la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión PA23', y los números debajo representan los números de la secuencia aminoacídica desde el extremo N de PA23'. β -gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β -galactosidasa de *E. coli*, GLP-1(7-37) representa el péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 153 (arginina). Los residuos de arginina se muestran en negrita. El sitio de escisión principal de proteasa OmpT de la proteína de fusión PA23' se representa por una cuña negra. Los residuos introducidos por sustitución aminoacídica en PA23' para las proteínas de fusión PA3D23', PA4D23', PA5D23' y PA23' se muestran en cursiva y el sitio de escisión de proteasa OmpT se indica por \downarrow . A la derecha, se muestran las eficacias de escisión para el sitio Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ (círculos negros) y el sitio Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ (círculos blancos) en cada proteína de fusión, siendo la eficacia de escisión de la proteína de fusión PA de 100%. ND simboliza "no detectado".

55 La Fig. 5 muestra las estructuras de las proteínas de fusión PRMT y PMT. Los números sobre las secuencias aminoacídicas de las proteínas de fusión representan los números de la secuencia aminoacídica desde el extremo N respectivo. β -gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β -galactosidasa de *E. coli* y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 143

(arginina) en PRMT o de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 143 (arginina) en PMT. La secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 140 de la proteína de fusión PRMT coincide con la secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 140 desde el extremo N de la proteína de fusión PRR (véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803) cuya estructura se muestra en la Fig. 1. También, la secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 de la proteína de fusión PMT coincide con la secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 desde el extremo N de la proteína de fusión PA23' (Fig. 4). El sitio de escisión de proteasa OmpT de la proteína de fusión PMT está indicado por círculos blancos, y el sitio de escisión de la variante D97M de proteasa OmpT está indicado por círculos negros. RAR-motilina es un polipéptido que comprende Arg-Ala-Arg-motilina liberado a partir de PMT mediante escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y RRAR-motilina es un polipéptido que comprende Arg-Arg-Ala-Arg-motilina liberado a partir de PMT mediante escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰.

La Fig. 6 muestra los resultados de los análisis de HPLC de las reacciones (25°C, 120 min) entre las proteínas de fusión PRMT y PMT y la proteasa OmpT de tipo silvestre y la variante D97M de proteasa OmpT.

La Fig. 7 es una gráfica que muestra el cambio dependiente del tiempo de la DO₆₆₀ de la disolución de cultivo de cultivos de 2 l de alta densidad de bacterias W3110 M25 que expresan PMT y de bacterias W3110 M25 que expresan OmpT D97M. El símbolo "círculos blancos" representa W3110 M25 PMT y el símbolo "círculos negros" representa W3110 M25 OmpT D97M. Se inició el cultivo en glucosa al 1,5% a 32°C con *E. coli* recombinante, se añadió glicerol al 2% tras el agotamiento de la glucosa aproximadamente a las 12 horas después del inicio del cultivo, se ajustó la temperatura del cultivo a 37°C y se continuó la adición de glicerol para mantener una concentración del 2% con cada agotamiento del glicerol (W3110 M25 PMT, ↑; W3110 M25 OmpT D97M, ↓). Se terminó el cultivo de W3110 M25 PMT después de 24 horas y se terminó el cultivo de W3110 M25 OmpT D97M después de 20 horas.

La Fig. 8 es una gráfica que muestra el cambio dependiente del tiempo de la liberación de motilina a partir de la proteína de fusión PMT mediante la variante OmpT D97M de proteasa OmpT.

La Fig. 9 muestra los resultados del análisis de la disolución de reacción después de 60 minutos mediante (A) HPLC y (B) PAGE-SDS. Carril 1: PMT sola; 2: PMT+D97M; 3: muestra de motilina. Composición de la disolución de reacción: urea 4 M, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, DO₆₆₀ de PMT= 50, DO₆₆₀ de OmpT D97M= 16; temperatura de reacción: 25°C; agitación a 120 rpm.

La Fig. 10 muestra (A) la estructura de una proteína de fusión que expresa el plásmido construido para los ejemplos 1, 3, 5, 7, 9, 16 y 18; y (B) la estructura de un plásmido que expresa proteasa OmpT o variante de proteasa OmpT construido para el ejemplo 11.

La Fig. 11 muestra las estructuras de las proteínas de fusión PAC y PCT. Los números debajo de los aminoácidos de cada proteína de fusión representan los números de secuencia aminoacídica desde el extremo N. β-gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β-galactosidasa de *E. coli*, y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 143 (arginina). La secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 de la proteína de fusión PMT coincide con la secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 desde el extremo N de la proteína de fusión PA23' (Fig. 4).

La Fig. 12 muestra los resultados del análisis de HPLC de la reacción entre péptidos de fusión y proteasa OmpT de tipo silvestre y variantes de proteasa OmpT. Se efectuó la reacción a 25°C entre PAC y D97L durante 10 minutos, y entre PMT y D97H durante 2 horas.

La Fig. 13 muestra la estructura del plásmido que expresa la variante D97M de proteasa OmpT construido para el ejemplo 7. MCS es el sitio de clonación múltiple.

La Fig. 14 muestra los resultados del análisis de PAGE-SDS que indican la liberación de motilina humana a partir de la proteína de fusión PMT usando cuerpos de inclusión obtenidos de *E. coli* transformada con W3110 M25 que coexpresa la proteína de fusión PMT y la variante D97M de proteasa OmpT, preparada para el ejemplo 17. Mr = marcadores de peso molecular de proteína; carril 1: 20 minutos, 2: 40 minutos, 3: 60 minutos, 4: 120 minutos, 5: 180 minutos, 6: 240 minutos, 7: 300 minutos, 8: 360 minutos, 9: 1440 minutos (24 horas) después del inicio de la reacción; 10: muestra de motilina. Composición de la mezcla de reacción: urea 4 M, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, DO₆₆₀ del cuerpo de inclusión: 20, temperatura de reacción: 25°C.

La Fig. 15 muestra las estructuras de las proteínas de fusión PMT, PMT6D y PMT7D. Los números sobre las secuencias aminoacídicas de las proteínas de fusión representan los números de secuencia aminoacídica desde el extremo N respectivo. β-gal117S4H representa la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β-galactosidasa de *E. coli*, y el péptido ligador es la porción de secuencia aminoacídica de nº 128 (glutamina) a nº 143 (arginina). La secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 en las proteínas de fusión coincide con la secuencia aminoacídica hasta la arginina en posición 143 desde el extremo N de las proteínas de fusión PA23', PA3D23' y PA4D23' (Fig. 4). Los sitios de escisión de las proteínas de fusión por la variante D97M de proteasa OmpT se indican por flechas. AR-motilina es un polipéptido que comprende Ala-Arg-motilina liberado por la escisión en Arg¹⁴¹-Ala¹⁴², y RRAR-motilina es un polipéptido que comprende Arg-Arg-Ala-Arg-motilina liberado por la escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰.

La Fig. 16 muestra los resultados del análisis de HPLC para la reacción (25°C, 120 min) entre la proteína de fusión PMT y la variante D97M de proteasa OmpT. Los números entre paréntesis indican cada concentración de subproducto, siendo la concentración de motilina producida a partir de la proteína de fusión de 100.

5 La Fig. 17 muestra los resultados del análisis de HPLC para la reacción (25°C, 120 min) entre la proteína de fusión PMT6D y la variante D97M de proteasa OmpT. Los números entre paréntesis indican la concentración de cada subproducto, siendo la concentración de motilina producida a partir de la proteína de fusión de 100.

La Fig. 18 muestra los resultados del análisis de HPLC para la reacción (25°C, 120 min) entre la proteína de fusión PMT7D y la variante D97M de proteasa OmpT. Los números entre paréntesis indican la concentración de cada subproducto, siendo la concentración de motilina producida a partir de la proteína de fusión de 100.

10 Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle.

El plásmido pG117S4HompPRR es un plásmido de expresión que expresa una proteína de fusión (PRR) que comprende el péptido 1 de tipo glucagón (7-37) (GLP-1 (7-37)).

15 La proteína protegida de esta proteína de fusión está compuesta por β -gal117S4H que contiene los 117 aminoácidos N-terminales de β -galactosidasa de *E. coli* como proteína protectora, una secuencia ligadora que comprende 26 aminoácidos que contienen una secuencia de arginina-arginina y GLP-1(7-37). Los presentes inventores han descubierto ya que la proteasa OmpT de *E. coli* escinde el enlace peptídico central de la secuencia de arginina-arginina en la secuencia ligadora de PRR, liberando un polipéptido diana de 44 aminoácidos que contiene GLP-1(7-37) (Okuno, K. *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 127-134, 2002).

20 Los presentes inventores construyeron PA basándose en la proteína de fusión (PRR) como una proteína de fusión que tiene arginina en las posición P1 y P1' y que tiene todos los demás aminoácidos de las posiciones P10 a P5' reemplazados por alanina.

25 También se construyó una proteína de fusión (PAn) a partir de la proteína de fusión Pa y reemplazando la alanina de cada posición con arginina, y se examinó el efecto sobre la escisión con proteasa OmpT de situar el aminoácido básico arginina adyacente al sitio de escisión de proteasa OmpT.

Como resultado, se descubrió nuevamente que la eficacia de escisión puede aumentarse si está presente un aminoácido básico (por ejemplo, arginina o lisina) en las posiciones entre P10 y P3 o las posiciones P3' y P5' de la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión (excepto en los casos en que solo la posición P6 o P4 se reemplaza por un aminoácido básico).

30 Por otro lado, cuando P2 o P2' es arginina, la secuencia contiene tres argininas consecutivas en lugar de solo las dos argininas en las posiciones P1 y P1' situadas en el sitio de escisión, y en este caso se encontró en cambio que tenía una eficacia de escisión reducida. Esto es, aunque la eficacia de escisión aumenta si está presente arginina alrededor del sitio de escisión, la eficacia de escisión se reduce en el caso de tres argininas consecutivas, y por lo tanto la eficacia de escisión puede controlarse sustituyendo la arginina en la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión.

35 Para la proteína de fusión PA3' en la que está presente arginina en la posición P3' (secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión= -Ala-Ala-Arg[P1]-Arg[P1']-Ala-Arg[P3']-Ala[P4]-Ala-), se encontró que ocurre también escisión entre la arginina en posición P3' y la alanina en posición P4', y se descubrió una secuencia que permitía una escisión eficaz en el sitio de arginina-alanina. Puesto que el hecho de que el sustrato se escindiera eficazmente con una secuencia distinta de la que tiene aminoácidos básicos consecutivos es extremadamente importante para usar la proteasa OmpT como enzima procesadora, los presentes inventores llevaron a cabo investigaciones adicionales.

40 Tras investigar diversas secuencias aminoacídicas basándose en el conocimiento de que la eficacia de escisión aumenta al situar arginina adyacente al sitio de escisión y el conocimiento de que tres argininas consecutivas vuelven más difícil la escisión entre arginina-arginina, se encontró que en la secuencia aminoacídica Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-, ocurre la escisión principal en Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-. En otras palabras, esto demostró la propiedad de que situar tres aminoácidos básicos consecutivos promueve la escisión en los sitios aminoacídicos básicos después de ellos.

45 Sin embargo, la escisión ocurría en la secuencia aminoacídica anteriormente mencionada (-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-) incluso en la secuencia de tres residuos de arginina consecutivos. Para inhibir esto, se construyó la secuencia aminoacídica -Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala- que tenía ácido aspártico situado como aminoácido ácido en la secuencia aminoacídica en dirección 5' del extremo N-terminal. Se redujo la eficacia de escisión arginina-alanina a la mitad usando esta secuencia, pero se inhibió exitosamente la escisión en la secuencia de tres argininas consecutivas. Es decir, la escisión por proteasa OmpT puede optimizarse para una escisión más fácil entre arginina-alanina en -Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala- y Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-. Se pensó que usar estas secuencias (-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala- y Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-), y lo más preferiblemente Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-, permitiría una escisión eficaz incluso cuando en la posición P1' estuviera un aminoácido distinto de alanina.

Basándose en estos resultados, se examinó la motilina (con fenilalanina como aminoácido N-terminal) como polipéptido diana para determinar si situar o no un péptido fisiológicamente activo en la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal del sitio de escisión -Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala- permite la escisión directa de péptido fisiológicamente activo a partir de una proteína de fusión con proteasa OmpT. Se construyó la proteína de fusión PMT con motilina como polipéptido diana y se hizo reaccionar con proteasa OmpT en un intento de separar la motilina.

Sin embargo, se mostró que la motilina no se separa eficazmente de la proteína de fusión PMT. Este resultado sugería que, aunque es conocido que la especificidad de sustrato de la proteasa OmpT es tolerante con respecto al aminoácido en posición P1', una escisión más eficaz requiere la introducción de una mutación en la proteasa misma para aumentar la especificidad por el aminoácido en posición P1'.

Se ha publicado ya bibliografía que analiza la estructura cristalina de OmpT (Vandeputte-Rutten, L. *et al.* *EMBO J.* 20: 5033-5039, 2001), y un informe relacionado (Kramer, RA. *et al.* *FEBS Lett.* 505: 426-430, 2001) sugiere una posible interacción entre el aminoácido de la posición P1' del sustrato y Asp⁹⁷ (ácido aspártico en posición 97 desde el extremo N) de la proteasa OmpT. Para investigar el cambio de especificidad de sustrato resultante de la sustitución de un aminoácido en posición 97, se creó un plásmido para un mutante que tiene Asp⁹⁷ de OmpT reemplazado por los 20 aminoácidos diferentes (incluyendo sustitución sinónima por ácido aspártico) y se introdujeron estos en *E. coli* BL21 deficiente en OmpT para preparar 20 cepas de *E. coli* que expresaran las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT (en que X corresponde a los 20 aminoácidos).

Para examinar la especificidad de sustrato en la posición P1' de proteasa OmpT, se hicieron reaccionar estos con la proteína de fusión PRX (en que X corresponde a los 20 aminoácidos, véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803) que tiene la estructura mostrada en la Fig. 1, y se investigó la escisión de cada proteína de fusión. Como resultado, las enzimas en que se reemplazó el ácido aspártico en posición 97 de proteasa OmpT por alanina, leucina, fenilalanina, metionina, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, ácido glutámico e histidina exhibían una actividad de escisión por las proteínas de fusión PRX; pero con variación de las eficacias de escisión. En particular, la variante OmpT D97L exhibía una alta especificidad por serina y alanina, la OmpT D97M por fenilalanina, alanina, serina, cisteína y tirosina y la OmpT D97H por alanina, valina, isoleucina, metionina, treonina, cisteína y asparagina.

Basándose en estos hallazgos, y considerando que el aminoácido N-terminal de la motilina es fenilalanina, se hizo reaccionar la proteína de fusión PMT anteriormente mencionada con OmpT D97M que exhibía una buena escisión por fenilalanina en posición P1', con lo que fue posible separar eficazmente la motilina. Esto es, al optimizar la secuencia adyacente al sitio de escisión de proteasa OmpT y utilizar una variante de proteasa OmpT, los presentes inventores tuvieron éxito en conseguir la escisión con la proteasa OmpT con la que la escisión en sitios deseados ha sido difícil.

También, para verificar que el método es industrialmente aplicable, se cultivaron *E. coli* que expresan proteína de fusión PMT y *E. coli* que expresan la variante D97M de proteasa OmpT a alta densidad y se añadió directamente la *E. coli* que expresa la variante D97M de proteasa OmpT misma a una disolución de reacción que contiene cuerpos de inclusión preparados a partir de *E. coli* que expresa la proteína de fusión PMT y se dejaron reaccionar a 25°C durante 1 hora. Después de añadir ácido acético 20 mM (pH 4,0) a la disolución de reacción, y retirar el precipitado, se suministró el sobrenadante a intercambio catiónico y cromatografía en fase inversa. Este procedimiento permitió la producción de 160 mg/l de disolución de cultivo de *E. coli* que expresa proteína de fusión PMT a un rendimiento de un 52% de motilina con un pureza de 99,0% o mayor, que es un nivel industrialmente aceptable.

Para confirmar la utilidad general de este sistema de producción de polipéptidos, se preparó una proteína de fusión que comprendía hormona adrenocorticotrófica humana (1-24) (aminoácido N-terminal: serina) como polipéptido diana y precursor de calcitonina humana (aminoácido N-terminal: cisteína) y se trató con la variante de proteasa OmpT. Como resultado, fue posible obtener el polipéptido diana deseado en todos los casos, demostrando por tanto la utilidad general del sistema.

Se preparó *E. coli* que coexpresaba la proteína de fusión PMT y la variante D97M de proteasa OmpT y se confirmó que la motilina humana puede liberarse a partir de la proteína de fusión PMT mediante una sencilla disolución en urea de los cuerpos de inclusión obtenidos cultivando la *E. coli*.

Los procedimientos experimentales específicos no descritos en los ejemplos proporcionados a continuación fueron los siguientes, a menos que se especifique otra cosa.

(1) Construcción de plásmidos de expresión

Se construyeron plásmidos de expresión mediante un protocolo ordinario usando *E. coli* JM109. Se confirmó la identidad del plásmido de expresión construido como plásmido diana mediante la determinación de la secuencia de ADN de la región de ADN obtenida por PCR para introducción de mutaciones y de la región de ADN obtenida mediante sustitución por ADN sintético. Se muestran las estructuras de los plásmidos construidos para los ejemplos 1, 3, 5, 7, 9, 16 y 18 en la Fig. 10A, y se muestra la estructura del plásmido construido para el ejemplo 11 en la Fig. 10B. El plásmido construido para el ejemplo 17 se muestra en la Fig. 13.

(2) Ensayo de la actividad de la enzima proteasa OmpT

Se ensayó la actividad de la proteasa OmpT usando dinorfina A (Peptide Research Laboratory) como sustrato.

Después de añadir 5 µl de dinorfina A 1 mg/ml a 40 µl de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0) que contenía 0,1% de Triton X100, se añadió una muestra de ensayo de actividad proteasa OmpT de 5 µl a la misma y se inició la reacción. Se efectuó la reacción a 25°C durante 10 minutos y se terminó mediante la adición de 5 µl de HCl 1 N. Se centrifugó la disolución de reacción a 10.000 x g durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante y se suministraron 20 µl del mismo para análisis de HPLC.

Se llevó a cabo el análisis de HPLC usando una columna YMC PROTEIN RP, con una temperatura de columna de 40°C y un caudal de 1 ml/min. Después de aclarar con acetonitrilo al 10% que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético durante 3 minutos, se efectuó la elución con un gradiente lineal de acetonitrilo al 10-15% que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético durante 10 minutos. Se monitorizó la absorción a 220 nm y se detectó el péptido producto de descomposición Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg. La actividad proteasa OmpT tras la escisión de 1 µmol de dinorfina A a 25°C durante 1 minuto se definió como 1 unidad.

(3) Electroforesis en SDS-poliacrilamida

La electroforesis en SDS-poliacrilamida usada para investigar la escisión de la proteína de fusión empleaba Peptide-PAGEmini al 16% de Tefco como gel, tampón de electroforesis de tricina de Biorad como tampón de electroforesis y un marcador de peso molecular de proteína de Tefco o Biorad como marcador de peso molecular. Se añadió un equivalente de tampón de muestra 2xSDS-PAGE que contenía urea 4 M a la muestra antes de calentar a 100°C durante 5 minutos. Se suministró una porción de 10 µl para electroforesis y se llevó a cabo la electroforesis en las condiciones de electroforesis indicadas por Tefco. Después de la electroforesis, se efectuó una tinción con una disolución de tinción que contenía azul brillante de Coomassie R-250.

(4) Preparación de cuerpos de inclusión

En los ejemplos, se expresaron las proteínas de fusión como cuerpos de inclusión en *E. coli*, y aparece escisión por proteasa OmpT simplemente mediante disolución de los cuerpos de inclusión obtenidos en urea si la *E. coli* expresa también la proteasa OmpT. Para evitar la escisión, por lo tanto, se transformó la cepa de *E. coli* W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con el plásmido que expresa la proteína de fusión y se expresó cada proteína fusión como cuerpos de inclusión. La *E. coli* recombinante W3110 M25 que expresa cada proteína de fusión se sometió a cultivo giratorio a 150 rpm y 37°C durante una noche usando 400 ml de medio líquido LB (0,5% de extracto de levadura (p/v), 1% de triptona (p/v), 0,5% de cloruro de sodio) que contiene tetraciclina 10 mg/l en un matraz Erlenmeyer de 2 l.

Al día siguiente, se recuperaron las células mediante centrifugación a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos y se sometieron entonces a ultrasonificación para disgregación celular. Se añadió agua desionizada a las células disgregadas hasta 30 ml, se centrifugaron después a 4°C y 25.000 x g durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se recuperó la fracción precipitada (de cuerpos de inclusión). Se suspendió esta en 30 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM, 1% de Triton X-100 y se centrifugó a 4°C y 25.000 x g durante 15 minutos, obteniéndose un precipitado. Se suspendió el precipitado en 30 ml de agua desionizada, se centrifugó a 4°C y 25.000 x g durante 15 minutos y se recuperó el precipitado. Se añadió agua desionizada al mismo hasta 1,5 ml y se centrifugó la suspensión obtenida a 4°C y 10.000 x g durante 30 minutos, obteniéndose un precipitado y, después de repetir este procedimiento, se suspendió el precipitado en agua desionizada hasta $DO_{660} = 100$; se usaron los cuerpos de inclusión preparados de esta manera como sustrato para la reacción de proteasa OmpT.

(5) Reacción de proteasa OmpT

Se efectuó la reacción de proteasa OmpT usando la proteína de fusión como sustrato de la siguiente manera. Después de añadir 2,5 µl de fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) y 2 µl de EDTA 50 mM a 20 µl de urea 20 M, se añadieron 10 µl de cuerpos de inclusión de proteína de fusión ($DO_{660} = 100$) para la lisis de los cuerpos de inclusión. Se añadieron entonces 10,5 µl de agua, seguidos de 5 µl de 1,4 unidades/ml de proteasa OmpT, y se inició la reacción con un volumen de mezcla de reacción de 50 µl. La temperatura de reacción era de 25°C y se efectuó la reacción durante 30 minutos.

Se logró la cuantificación del polipéptido obtenido mediante la reacción con proteasa OmpT mediante HPLC en las siguientes condiciones, a menos que se especifique otra cosa. Se terminó la reacción mediante la adición de 150 µl de ácido acético al 6% y urea 2M a la mezcla de reacción de proteasa OmpT y, tras centrifugación a 10.000 x g durante 3 minutos, se suministraron 20 µl del sobrenadante a una columna YMC PROTEIN RP. Se llevó a cabo la HPLC a una temperatura de columna de 40°C y un caudal de 1 ml/min. Se efectuó la elución con un gradiente lineal de acetonitrilo al 30-50% que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético durante 20 minutos. Se monitorizó la absorción a 214 nm para la cuantificación del polipéptido.

(6) Análisis de masas del polipéptido

Para conjeturar la localización del sitio de escisión, se llevó a cabo el análisis de masas del polipéptido aislado por HPLC usando SSQ710 de Thermo Finnigan.

(7) Preparación de la fracción de membrana externa de *E. coli*

Se preparó una fracción de membrana externa de la siguiente manera para *E. coli* que expresa proteasa OmpT o variante de proteasa OmpT con W3110 M25 como células hospedadoras, y se usó la fracción como proteasa OmpT o variante de proteasa OmpT para la reacción de escisión de proteína de fusión en los Ejemplos 10, 14, 16 y 18. Se efectuó el método de cultivo como en (4) anteriormente, y tras la terminación del cultivo, se obtuvieron células mediante centrifugación a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos. Se suspendieron las células en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (TE) y se disgregaron mediante ultrasonificación. Se centrifugaron las células disgregadas a 4°C, 1000 x g durante 10 minutos, se desechó el precipitado y se recuperó el sobrenadante. Se centrifugó entonces a 4°C, 36.000 x g durante 40 minutos y se recuperó el precipitado, se suspendió en TE y se centrifugó de nuevo a 4°C, 36.000 x g durante 40 minutos. Se suspendió el precipitado obtenido en TE hasta $DO_{660} = 10$. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de proteínas de fusión PAn

La proteasa OmpT es una endoproteasa encontrada en la membrana externa de *E. coli*. Puesto que los aminoácidos básicos de la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión tienen un efecto importante sobre la escisión por esta enzima, los presentes inventores utilizaron el sitio de escisión conocido de la enzima para el experimento descrito a continuación para investigar la relación entre la posición del aminoácido básico y la eficacia de escisión.

Se sustituyó arginina por alanina en las posiciones P10 a P2 y las posiciones P2' a P5' del sitio de escisión de la proteína de fusión PA (una proteína de fusión que comprende la proteína protectora derivada de 117 aminoácidos desde el extremo N de β -galactosidasa a *E. coli* (β -gal117S4H) y péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) (GLP-1(7-37) a través de un péptido ligador) mostrada en la Fig. 2 que tiene una estructura que se escinde por la proteasa OmpT, creando las proteínas de fusión PAn (Fig. 2: en que n corresponde a la posición aminoacídica [Pn] en el sitio de escisión, de P10 a P2 y de P2' a P5') que tienen un sitio de escisión por proteasa OmpT alterado en el péptido ligador, para examinar la escisión por proteasa OmpT.

Se usó el plásmido pG117S4HompPRR (véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803), que tiene la estructura mostrada en la Fig. 10A, que es un plásmido de expresión para la proteína de fusión PRR (Fig. 1) que tiene una secuencia de arginina-arginina insertada en la porción ligadora de la proteína de fusión como sitio de reconocimiento/escisión por proteasa OmpT de *E. coli*, como base para la construcción del plásmido pG117S4HompPA, que tiene la estructura mostrada en la Fig. 10A, que es un plásmido que expresa la proteína de fusión PA, mediante mutagénesis dirigida a sitio y sustitución por ADN sintético. También se construyó el plásmido pG117S4HompPAn de expresión de la proteína de fusión PAn introduciendo sustituciones de bases por PCR en el plásmido pG117S4HompPA de expresión de la proteína de fusión PA, que tiene la estructura mostrada en la Fig. 2. Se muestra la estructura del plásmido construido en la Fig. 10A. Se transformó la cepa *E. coli* W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con estos plásmidos de proteína de fusión, y se expresaron las proteínas de fusión como cuerpos de inclusión.

Ejemplo 2. Escisión de proteínas de fusión PAn por proteasa OmpT

Se examinó la eficacia de escisión por proteasa OmpT usando cada proteína de fusión PAn (Fig. 2) en las que se sustituyó arginina por diferentes alaninas adyacentes al sitio de escisión por proteasa OmpT de la proteína de fusión PA mostrada en la Fig. 2, que tiene una estructura que se escinde por proteasa OmpT. Se hizo reaccionar cada PAn con una muestra de proteasa OmpT purificada usando Benzamidine Sepharose 6B a pH 7,0 según la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803. La Fig. 2 muestra también las eficacias de escisión obtenidas a partir de los resultados del análisis por HPLC después de la reacción enzimática. La Fig. 2 muestra adicionalmente los sitios de escisión obtenidos a partir de los resultados de análisis de masas.

Todas las proteínas PAn experimentaron escisión por proteasa OmpT en el mismo sitio que PA, mientras que PA2, PA2' y PA3' experimentaron también escisión en otros sitios (Fig. 2). En particular, PA3' se escindió en dos sitios Arg¹⁴⁰-Arg¹¹¹ y Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ (eficacias de escisión: 220%, 73%), indicando por tanto escisión en un sitio distinto de los aminoácidos básicos consecutivos (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴).

Se observó un aumento de la eficacia de escisión para todas las proteínas PAn excepto para PA2 y PA2', sugiriendo que la eficacia de escisión puede mejorarse situando arginina en las posiciones P10 a P3 y las posiciones P3' a P5' de la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión. Entre estas, PA4 tenía una eficacia de escisión máxima de aproximadamente 5 veces la de PA, y por lo tanto se mostró que la sustitución de arginina en posición 4 era la más eficaz. Por otro lado, las eficacias de escisión de PA2 y PA2' se redujeron a aproximadamente 1/3, indicando que la eficacia de escisión se reduce con una secuencia de tres argininas consecutivas.

Ejemplo 3. Preparación de las proteínas de fusión PA1A3', PA1'A3'

La proteasa OmpT es conocida por ser una enzima que escinde principalmente entre aminoácidos básicos consecutivos. Sin embargo, los resultados del ejemplo 2 demostraron que la proteína de fusión PA3' se escinde en dos

sitios: Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴, y que uno de ellos es la escisión -Arg↓Ala-. La eficacia de escisión en -Arg↓Ala- es baja en comparación con la eficacia de escisión entre aminoácidos básicos, pero se ha especulado que esta podría mejorarse hasta una eficacia de escisión industrialmente útil.

5 Por lo tanto, para inhibir la escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ entre los dos sitios de escisión Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ de la proteína de fusión PA3', se prepararon las proteínas de fusión PA1A3' y PA1'A3' (Fig. 3) que tienen una secuencia aminoacídica con alanina sustituyendo a Arg¹⁴⁰ o Arg¹⁴¹, y se examinó su escisión con proteasa OmpT. Se investigó también si Arg¹⁴⁰ (posición 4, en que Arg¹⁴³ y Ala¹⁴⁴ son las posiciones P1 y P1', respectivamente) y Arg¹⁴¹ (posición P3, en que Arg¹⁴³ y Ala¹⁴⁴ son las posiciones P1 y P1', respectivamente) son necesarias para la escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ usando estas proteínas de fusión.

10 Se construyeron los plásmidos pG117S4HompPA1A3' y pG117S4HompPA1'A3' de expresión de las proteínas de fusión PA1A3' y PA1'A3' introduciendo sustituciones de bases por PCR en el plásmido pG117S4HompPA3' de expresión de la proteína de fusión PA3' que tiene la estructura mostrada en la Fig. 3. Se muestran las estructuras de los plásmidos construidos en la Fig. 10A. Se transformó la cepa *E. coli* W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con plásmidos que expresan proteína de fusión, y se expresó cada proteína de fusión como cuerpos de inclusión.

15 Ejemplo 4. Escisión de las proteínas de fusión PA1A3' y PA1'A3' con proteasa OmpT

Se investigaron los sitios de escisión y eficacias de escisión con proteasa OmpT para las proteínas de fusión PA1A3' y PA1'A3' mostradas en la Fig. 3. Se hicieron reaccionar PA1A3' y PA1'A3' con una muestra de proteasa OmpT purificada usando Benzamidine Sepharose 6B a pH 7,0 según la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803. La Fig. 3 muestra también las eficacias de escisión obtenidas a partir de los resultados del análisis de HPLC después de la reacción enzimática, así como los sitios de escisión obtenidos a partir de los resultados del análisis de masas. Se escindieron ambas PA1A3' y PA1'A3' en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴.

20 Sin embargo, todas las eficacias de escisión eran menores que la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA. Se confirmó también la escisión en Arg¹⁴⁰-Ala¹⁴¹ en PA1'A3'. Si Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ se considera como el sitio de escisión P1-P1', esto sugiere que la escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ ocurre siempre que la arginina esté presente en la posición P3 (Arg¹⁴¹ en PA1A3') o la arginina esté presente en la posición P4 (Arg¹⁴⁰ en PA1'A3'), pero que PA3' con arginina situada en ambas posiciones P4 y P3 tiene una mayor eficacia de escisión que PA1A3' y PA1'A3'.

25 Ejemplo 5. Preparación de las proteínas de fusión PA23', PA323' y PA2'3'

Los resultados del Ejemplo 4 demostraron que las proteínas de fusión PA1A3' y PA1'A3' se escinden en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴, y notablemente solo en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ en PA1A3', pero las eficacias de escisión eran bajas. Por tanto, se introdujeron sustituciones aminoacídicas en la proteína de fusión PA3' para diseñar una secuencia aminoacídica con una eficacia de escisión aumentada en -Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴). Basándose en los resultados del Ejemplo 2, se prepararon las proteínas de fusión PA23', PA323' y PA2'3' (Fig. 3) de la siguiente manera, que tienen una secuencia aminoacídica (con 3 o 4 argininas consecutivas en lugar de 2 argininas consecutivas) que se esperaba que aumentara la eficacia de escisión en -Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴) y redujera la eficacia de escisión entre los aminoácidos básicos consecutivos (Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹), y se investigó su escisión con proteasa OmpT.

30 Se construyeron los plásmidos pG117S4HompPA23' y pG117S4HompPA2'3' de expresión de las proteínas de fusión PA23' y PA2'3' introduciendo sustituciones de bases por PCR en el plásmido pG117S4HompPA3' de expresión de la proteína de fusión PA3' que tiene la estructura mostrada en la Fig. 3. Se construyó también el plásmido pG117S4HompPA323' de expresión de la proteína de fusión PA323' introduciendo una sustitución de base por PCR en el plásmido pG117S4HompPA23' de expresión de la proteína de fusión PA23' que tiene la estructura mostrada en la Fig. 3. Se muestran las estructuras de los plásmidos construidos en la Fig. 10A. Se transformó la cepa *E. coli* W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con plásmidos que expresan proteínas de fusión, y se expresó cada proteína de fusión como cuerpos de inclusión.

35 Ejemplo 6. Escisión de las proteínas de fusión PA23', PA323' y PA2'3' con proteasa OmpT

45 Se investigaron los sitios de escisión y eficacias de escisión con proteasa OmpT para las proteínas de fusión PA23', PA323' y PA2'3' mostradas en la Fig. 3. Se hicieron reaccionar PA23', PA323' y PA2'3' con una muestra de proteasa OmpT purificada usando Benzamidine Sepharose 6B a pH 7,0 según la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803, a 25°C durante 30 minutos. La Fig. 3 muestra también las eficacias de escisión obtenidas a partir de los resultados del análisis de HPLC después de la reacción enzimática, así como los sitios de escisión obtenidos a partir de los resultados del análisis de masas. Se confirmó que PA23', PA323' y PA2'3' se escinden en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴. La eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ de PA23' era 2,9 veces la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA.

50 Se observó también escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, pero era un 13% de la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴. La eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ de PA323' era también 2,9 veces la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA, pero se observó también escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, a un 59% de la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴. En PA2'3', la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ era baja, a un 63% de la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA, y se confirmó también escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y Arg¹⁴²-Arg¹⁴³. Esto indicaba que, entre estas tres proteínas de fusión,

PA23' tiene la secuencia óptima para aumentar la eficacia de escisión en -Arg↓-Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴) y reducir la eficacia de escisión entre aminoácidos básicos consecutivos.

Ejemplo 7. Preparación de las proteínas de fusión PA5D23', PA4D23' y PA3D23'

- 5 Los resultados del Ejemplo 6 demostraron que la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ en la proteína de fusión PA23' es muy alta. Sin embargo, se confirmó también escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹. Por tanto, puesto que la escisión se inhibe presuntamente cuando están presentes aminoácidos ácidos cerca del sitio de escisión, se prepararon de la siguiente manera las proteínas de fusión PA5D23', PA4D23' y PA3D23' (Fig. 4) que tienen Ala¹³⁶, Ala¹³⁷ y Ala¹³⁸ sustituidas por ácido aspártico para inhibir la escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, y se investigó su escisión por proteasa OmpT.
- 10 Los plásmidos pG117S4HompPA5D23', pG117S4HompPA4D23' y pG117S4HompPA3D23' de expresión de las proteínas de fusión PA5D23', PA4D23' y PA3D23' se construyeron introduciendo sustituciones de bases por PCR en el plásmido pG117S4HompPA23' de expresión de la proteína de fusión PA23', que tiene la estructura mostrada en la Fig. 4. Las estructuras de los plásmidos construidos se muestran en la Fig. 10A. Se transformó la cepa E. coli W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con los plásmidos que expresan proteína de fusión y se expresó cada proteína de fusión
- 15 como cuerpos de inclusión.

Ejemplo 8. Escisión de las proteínas de fusión PA5D23', PA4D23' y PA3D23' con proteasa OmpT

- 20 Se investigaron los sitios de escisión y eficacias de escisión con proteasa OmpT para las proteínas de fusión PA5D23', PA4D23' y PA3D23' mostradas en la Fig. 4. Se hicieron reaccionar PA5D23', PA4D23' y PA3D23' con una muestra de proteasa OmpT purificada usando Benzamidine Sepharose 6B a pH 7,0 según la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803, a 25°C durante 30 minutos. La Fig. 4 muestra también las eficacias de escisión obtenidas a partir de los resultados de análisis de HPLC después de la reacción enzimática, así como los sitios de escisión obtenidos a partir de los resultados de análisis de masas. Se confirmó que el sitio de escisión principal de PA5D23', PA4D23' y PA3D23' es Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴.

- 25 En particular, la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ de PA4D23' era baja en comparación con PA23', pero el doble de la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA. Por otro lado, no se detectó escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ como se detectó con PA23'. Es decir, si Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ se considera como P1-P1', su escisión se inhibía probablemente por el ácido aspártico en posición P3. De forma similar, si se considera Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ como P1-P1', su escisión se inhibía probablemente por el ácido aspártico en posición P2. La eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ de PA5D23' era también 1,9 veces la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA, pero se observó también escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹.

- 30 Para PA3D23', no se detectó escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, de forma similar a PA4D23'. Es decir, si Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ se considera como P1-P1', su escisión se inhibía probablemente por el ácido aspártico en posición P4. De forma similar, si se considera Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ como P1-P1', su escisión se inhibía probablemente por el ácido aspártico en posición P3. Sin embargo, la eficacia de escisión en Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ era aproximadamente la misma que la eficacia de escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PA, y menor que en PA4D23'. Esto indicaba que, entre estas tres proteínas de fusión,
- 35 PA4D23' tiene la secuencia óptima para aumentar la eficacia de escisión en -Arg↓-Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴) y reducir la eficacia de escisión entre aminoácidos básicos consecutivos.

- 40 Esto sugiere la posibilidad de que, cuando se usa la proteasa OmpT para separar un polipéptido diana, en el que el aminoácido N-terminal es cualquiera de los 17 aminoácidos distintos de ácido aspártico, glutamina y prolina, de una proteína de fusión que tiene la estructura: proteína protectora-péptido ligador-polipéptido diana, es posible una escisión específica situando el polipéptido diana después del extremo C de la secuencia aminoacídica -Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-.

Ejemplo 9. Preparación de las proteínas de fusión PRMT y PMT

- 45 Los resultados del Ejemplo 6 indicaban que la proteasa OmpT puede escindir eficazmente -Arg↓-Ala- en la secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión de esta enzima en la proteína de fusión PA23' mostrada en la Fig. 3. Basándose en estos resultados, se predijo que debería ser posible una escisión eficaz incluso con un sitio de escisión -ArgXaa- (en que Xaa es cualquiera de los 17 aminoácidos distintos de los aminoácidos ácidos ácido aspártico y glutamina o prolina). Los presentes inventores examinaron por lo tanto cómo se ve afectada la escisión por esta enzima cuando el extremo N después de la arginina en posición 143 de la proteína de fusión PA23' usada en el Ejemplo 6 es un aminoácido distinto de un aminoácido ácido o prolina, y se reemplaza por un aminoácido distinto de un aminoácido
- 50 básico.

- 55 En primer lugar, se construyó la proteína de fusión PRMT (Fig. 5) como control, que tiene motilina humana situada después de la arginina en posición 140 desde el extremo N de la proteína de fusión PRR (véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803), que tiene la estructura mostrada en la Fig. 1, que se escinde en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ por la proteasa OmpT. A continuación, se construyó la proteína de fusión PMT (Fig. 5), que tiene motilina humana situada después de la arginina en posición 143 desde el extremo N de la proteína de fusión PA23' (Fig. 3 y 4).

Las estructuras del plásmido pG11754HompPRMT de expresión de la proteína de fusión PRMT y el plásmido pG117S4HompPMT de expresión de la proteína de fusión PMT se muestran en la Fig. 10A. Se transformó la cepa *E. coli* W3110 M25 deficiente en proteasa OmpT con los dos plásmidos que expresan proteína de fusión, creando cepas productoras de proteína de fusión. Se cultivaron las cepas bacterianas obtenidas y se prepararon las proteínas de fusión PRMT y PMT como cuerpos de inclusión.

Ejemplo 10. Escisión de las proteínas de fusión PRMT y PMT por la proteasa OmpT

Se examinó la escisión de las proteínas de fusión PRMT y PMT mostrada en la Fig. 5 por la proteasa OmpT mediante PAGE-SDS y HPLC, usando la fracción de membrana de *E. coli* W3110 M25 que expresa proteasa OmpT como células hospedadoras. En la PAGE-SDS, se confirmó la escisión de la proteína de fusión PMT por la proteasa OmpT pero no se detectó escisión de PRMT. La HPLC confirmó también la escisión de la proteína de fusión PMT, pero era escisión principalmente entre los aminoácidos básicos Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ o Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, mientras que solo se detectó una muy pequeña cantidad de fragmento de escisión peptídico de Arg¹⁴³-Phe¹⁴⁴, concretamente motilina humana, mediante análisis de masas.

Esto demostró que la motilina humana no puede separarse en el sitio de escisión peptídica primario por la proteasa OmpT usando simplemente -Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-motilina como secuencia aminoacídica adyacente al sitio de escisión. Se sugirió por tanto que, aunque la especificidad de sustrato de esta proteasa es tolerante con respecto al aminoácido en posición P1', una escisión más eficaz requiere la introducción de una mutación en la proteasa misma para aumentar la especificidad por el aminoácido en la posición P1'. Por tanto, se creó una variante de proteasa OmpT y se examinó si la motilina humana puede separarse principalmente o no de la proteína de fusión usándola.

Ejemplo 11. Preparación de *E. coli* que expresa la variante de proteasa OmpT

Observando que la bibliografía que analiza la estructura cristalina de la proteasa OmpT (Vandeputte-Rutten, L. *et al.* EMBO J. 20: 5033-5039, 2001) y un informe relacionado (Kramer, RA. *et al.* FEBS Lett. 505: 426-430, 2001) sugieren una posible interacción entre el aminoácido en posición P1' del sustrato y el Asp⁹⁷ de la proteasa OmpT, se creó un plásmido que tiene el Asp⁹⁷ de la proteasa OmpT reemplazado por 20 aminoácidos diferentes (incluyendo sustitución sinónima por ácido aspártico) usando PCR de la manera descrita a continuación, y se introdujeron estos en *E. coli* BL21 deficiente en OmpT para preparar 20 cepas de *E. coli* que expresan variantes de proteasa OmpT.

Para facilitar la introducción de mutaciones en Asp⁹⁷ de la proteasa OmpT y minimizar la región de ADN amplificada por PCR, se construyó en primer lugar un plásmido pOmpTXbal que expresa proteasa OmpT que tiene un sitio de endonucleasa de restricción Xbal introducido usando PCR para sustitución por TCT de la codificación AGT de Ser⁹⁹ de la proteasa OmpT en el plásmido pOmpTTcE que expresa la proteasa OmpT (véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803), que tiene la estructura mostrada en la Fig. 10B. A continuación, se construyeron los plásmidos pOmpTD97X que expresan las variantes OmpT D97X (en que X representa aquí uno de los 20 aminoácidos sustituidos) que tienen los 20 aminoácidos sustituyentes de Asp⁹⁷ de la proteasa OmpT (incluyendo la sustitución sinónima por ácido aspártico), introduciendo mutaciones en el plásmido pOmpTXbal que expresa proteasa OmpT usando PCR. Se muestran las estructuras de los plásmidos de expresión pOmpTXbal y pOmpTD97X en la Fig. 10B.

Se transfirieron los veinte plásmidos de expresión pOmpTD97X resultantes cada uno a *E. coli* BL21 deficiente en proteasa OmpT, preparando 20 cepas de *E. coli* que expresan las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT. Se cultivaron con agitación las cepas de *E. coli* a aproximadamente DO₆₆₀ = 1 en un tubo de ensayo a 37°C usando 2 ml de caldo LB que contenía tetraciclina 10 µg/ml, y se recuperaron entonces las células mediante centrifugación. A continuación, se añadió 1 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a las mismas para suspensión y se recuperaron las células mediante centrifugación. Se repitió también el mismo procedimiento para obtener células a las que se añadió TE hasta DO₆₆₀ = 2, formando suspensiones para uso como suspensiones celulares para reacción de las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT. Se almacenaron las suspensiones celulares a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 12. Confirmación de los niveles de expresión de variante de proteasa OmpT en suspensiones celulares de *E. coli* que expresan variantes de proteasa OmpT

Para confirmar que los niveles de expresión de las variantes de proteasa OmpT en las suspensiones celulares de *E. coli* que expresan variantes de proteasa OmpT eran todos equivalentes en las suspensiones celulares, se usó anticuerpo anti-proteasa OmpT para transferencia Western e inmunotinción. Se preparó el anticuerpo anti-proteasa OmpT inmunosensibilizando conejos con proteasa OmpT purificada, purificando la fracción Ig del antisuero y recuperándolo de la fracción con afinidad por proteasa OmpT purificada.

Se suministró la suspensión celular correspondiente a DO₆₆₀ = 0,01 por carril a PAGE-SDS al 12% y, después de la terminación de la electroforesis, se usó una membrana de PVDF para transferencia Western. Se sumergió la membrana de transferencia purificada en disolución de bloqueo (leche desnatada al 5% (p/v)/1x TBST*) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se sumergió la membrana en una dilución de 1000 x de anticuerpo anti-proteasa OmpT en disolución de bloqueo y se agitó durante 100 minutos a temperatura ambiente. Se desechó la disolución y se efectuó el lavado tres veces con 1x TBST* durante 5 minutos. Se sumergió entonces la membrana en disolución de anticuerpo de IgG anti-conejo unido a peroxidasa diluida 1000 veces con disolución de bloqueo, y se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Después de lavar 4 veces con 1x TBST* durante 10 minutos, se efectuó la detección con un kit ECL (Amersham Pharmacia). No se detectó banda para las células hospedadoras *E. coli* BL21 deficientes en proteasa OmpT, mientras que se detectó una banda para las otras suspensiones celulares aproximadamente a la misma intensidad, indicando por tanto que el nivel de expresión de la variante de proteasa OmpT en la suspensión celular de *E. coli* que expresa variante de proteasa OmpT era aproximadamente igual en todas las suspensiones celulares. (*1x TBST = Tris-HCl 10 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM, 0,05% de Tween 20).

Ejemplo 13. Investigación de la especificidad de sustrato en posición P1' de las variantes OmpTD97X de proteasa OmpT

Debido a que la proteasa OmpT está presente en la membrana externa de *E. coli*, puede hacerse reaccionar con el sustrato mediante la sencilla adición de las células a la disolución de reacción. Por tanto, para determinar la especificidad de sustrato en posición P1' de las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT, se usaron las proteínas de fusión PRX (véase la solicitud de patente japonesa nº 2000-602803), que tienen las estructuras mostradas en la Fig. 1, como sustratos y se examinaron las reactividades con las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT de la siguiente manera. Después de añadir 2,5 µl de fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) y 2 µl de EDTA 50 mM a 20 µl de urea 10 M, se añadieron 5 µl de cuerpos de inclusión de proteína de fusión (DO₆₆₀= 100) para la lisis de los cuerpos de inclusión.

A continuación, se añadieron a los mismos 10,5 µl de agua, se añadieron adicionalmente 10 µl de suspensión celular de *E. coli* que expresa variante de proteasa OmpT preparada en el Ejemplo 11 y se inició la reacción a un volumen de disolución de reacción de 50 µl. Se efectuó la reacción a 25°C durante 60 minutos. Se logró la cuantificación de los fragmentos peptídicos obtenidos mediante la reacción por HPLC en las mismas condiciones que para la reacción de proteasa OmpT. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Escisión de las proteínas de fusión PRX con las variantes OmpT D97X de proteasa OmpT

Proteínas de fusión PRX	Variantes OmpT D97X de la proteasa OmpT											
	D97D	D97A	D97L	D97F	D97M	D97S	D97T	D97C	D97N	D97Q	D97E	D97H
PRA	5,4	3,8	7,1	3,1	6,0	4,0	6,8	6,2	3,8	4,0	6,5	8,4
PRV	3,5	-	-	-	3,0	-	-	3,2	-	-	5,0	7,8
PRI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1
PRF	-	-	4,7	-	7,7	-	3,7	4,6	-	-	3,4	4,1
PRM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6
PRS	3,9	-	9,1	-	7,1	-	7,4	5,6	4,1	4,4	7,2	8,7
PRT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0
PRC	3,1	-	3,9	-	6,5	3,1	4,6	4,8	-	4,1	6,9	11
PRY	-	-	3,2	-	6,2	-	-	-	-	-	-	-
PRN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5
PRK	88	-	-	-	-	-	-	3,9	-	-	39	4,5
PRR	100	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	49	4,6

Las eficacias de expresión se expresan respecto al 100% como eficacia de escisión para la reacción entre proteasa OmpT de tipo silvestre (D97D) y la proteína de fusión PRR. El símbolo "-" representa una eficacia de escisión relativa menor de un 3,0%. Las variantes de proteasa OmpT D97V, D97I, D97P, D97W, D97G, D97Y, D97K y D97R tenían eficacias de escisión relativas de menos de un 3,0% para todas las 20 proteínas de fusión de aminoácidos PRX. Las proteínas de fusión PRL, PRP, PRW, PRG, PRQ, PRO, PRE y PRH tenían eficacias de escisión relativas de menos de un 3% para todas las variantes OmpT D97X de la proteasa OmpT.

Como resultado, fue posible obtener varias variantes con eficacias de escisión relativamente altas y con diferentes especificidades que la proteasa OmpT de tipo silvestre. La mayor especificidad la exhibió D97D (de tipo silvestre) por las proteínas de fusión PRR y PRK, D97L por PRS, D97M por PRF y PRY y D97H por PRA, PRV, PRI, PRM, PRT, PRC y PRN. Entre estas, se usó la variante D97M que tenía una alta especificidad por PRF para la reacción con las proteínas de fusión PRMT y PMT preparadas en el Ejemplo 9, para examinar su capacidad de separar motilina humana.

Ejemplo 14. Liberación de motilina humana a partir de la proteína de fusión PMT por la variante D97M de proteasa OmpT

Se investigó la liberación de motilina humana a partir de las proteínas de fusión de motilina humana PRMT y PMT (Fig. 5) por la variante D97M de proteasa OmpT usando fracciones de membrana externa de *E. coli* que expresa proteasa OmpT de tipo silvestre (D97D) y la variante de proteasa OmpT D97M, con W3110 M25 como células hospedadoras. Después de añadir 2,5 µl de fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) y 2 µl de EDTA 50 mM a 20 µl de urea 10 M, se añadieron 10 µl de cuerpos de inclusión de proteína de fusión ($D_{660}=100$) para la lisis de los cuerpos de inclusión. Se añadieron entonces 10,5 µl de agua, seguidos de 5 µl de fracción de membrana externa de *E. coli* recombinante, y se inició la reacción con un volumen de disolución de reacción de 50 µl. La temperatura de reacción era de 25°C y se efectuó la reacción durante 120 minutos.

Se terminó la reacción mediante la adición de 150 µl de ácido acético al 6% y urea 2 M a la disolución de reacción y, tras centrifugación a 10.000 x g durante 3 minutos, se suministraron 50 µl de sobrenadante a una columna YMC PROTEIN RP. Se llevó a cabo la HPLC a una temperatura de columna de 40°C y un caudal de 1 ml/min. Se efectuó la elución con un gradiente lineal de 20-27,5% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético durante 15 minutos, y se monitorizó la absorción a 214 nm. Se identificó el sitio de escisión mediante el aislamiento de los fragmentos polipeptídicos y el análisis de masas. La Fig. 6 muestra los resultados del análisis de HPLC de la escisión de las proteínas de fusión de motilina humana PRMT y PMT por la proteasa OmpT D97D de tipo silvestre como control y la variante D97M. Los sitios de escisión y eficacias de escisión se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Liberación de motilina a partir de la proteína de fusión PMT por la variante OmpT D97M de proteasa OmpT

Proteína de fusión	D97M			D97D (de tipo silvestre)		
	Motilina*	RAR-motilina**	RRAR-motilina***	Motilina*	RAR-motilina**	RRAR-motilina***
PRMT	22	-	-	ND	-	-
PMT	78	ND	24	ND	23	100

ND = No detectado. "-" = Indetectable debido a la estructura de la proteína de fusión.

*Liberación por escisión en Arg¹⁴⁰-Phe¹⁴¹ de PRMT, y en Arg¹⁴³-Phe¹⁴⁴ de PMT

**Polipéptido que comprende Arg-Ala-Arg-motilina liberado por escisión en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ de PMT

***Polipéptido que comprende Arg-Arg-Ala-Arg-motilina liberado por escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ de PMT

Las eficacias de escisión se expresan como eficacias de escisión relativas a 100 como la eficacia de escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ en el caso de escisión de PMT por D97D de tipo silvestre. La PRMT no se escindía por D97D de tipo silvestre, mientras que la escisión de PMT era principalmente escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹. Sin embargo, cuando se usaba la variante D97M, se escindía PRMT y se liberaba motilina. Se escindía también PMT hasta motilina libre, pero la escisión se confirmó también en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰. Sin embargo, la cantidad de motilina liberada a partir de PMT era 3,5 veces mayor que a partir de PRMT. Este resultado indicaba que la variante D97M es necesaria para la separación de motilina, y que la eficacia de escisión de motilina varía dependiendo de la secuencia adyacente al sitio de escisión.

Ejemplo 15. Ejemplo de producción de polipéptido usando variante de proteasa OmpT y motilina como péptido modelo

Como ejemplo de producción de polipéptido usando una variante de proteasa OmpT, se cultivaron células W3110 M25 productoras de la proteína de fusión de motilina PMT (véase el Ejemplo 9) y células que expresan la variante OmpT D97M de proteasa OmpT (creadas transformando W3110 M25 con pOmpTD97M) cultivando cada una a alta densidad a escala de 2 l, se usaron las células W3110 M25 que expresan OmpT D97M para liberar motilina a partir de PMT y se purificaron entonces produciendo motilina. Esto se logró mediante las siguientes 3 etapas.

Se logró la cuantificación de motilina analizando la mezcla de reacción diluida con ácido acético al 6% y urea 2M, en las mismas condiciones que el análisis de HPLC descrito en el Ejemplo 14, usando motilina humana adquirida en el Peptide Research Laboratory como muestra patrón. Se analizó la pureza de la motilina mediante HPLC en las mismas condiciones que para cuantificación, excepto porque se efectuó la elución con un gradiente lineal de 0-50% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético durante 50 minutos.

(1) Cultivo a alta densidad a escala de 2 l de la cepa W3110 M25 productora de la proteína de fusión de motilina PMT y de la cepa que expresa la variante OmpT D97M de proteasa OmpT

Se llevó a cabo el cultivo de alta densidad de células W3110 M25 productoras de la proteína de fusión de motilina PMT y de células que expresan la variante OmpT D97M de la proteasa OmpT de la siguiente manera, y se prepararon cuerpos de inclusión y células que los expresan a partir de cada una. Se sometieron células productoras de PMT y células que expresan OmpT D97M a cultivo giratorio durante una noche en un matraz Erlenmeyer de 500 ml a 37°C

usando 100 ml de caldo LB que contiene tetraciclina 10 mg/l. Al día siguiente, se transfirió a un recipiente de cultivo centrífugo que contenía 2 l de media que comprendía K_2HPO_4 4 g/l, KH_2PO_4 4 g/l, Na_2HPO_4 2,7 g/l, NH_4Cl 0,2 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,2 g/l, extracto de levadura 4 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 40 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 40 mg/l, $MnSO_4 \cdot nH_2O$ 10 mg/l, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg/l, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg/l, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 mg/l, H_3BO_3 0,5 mg/l, glucosa 15 g/l y tetraciclina 10 mg/l, y se inició el cultivo a 32°C.

Después del agotamiento de la glucosa, se añadió glicerol al 2% y se aumentó la temperatura de cultivo a 37°C. Se continuó después de ello el cultivo añadiendo posteriormente glicerol al 2% a medida que se agotaba. Se muestra el transcurso del cultivo en la Fig. 7. La cepa productora de PMT completó el cultivo a las 24 horas después del inicio, y el volumen de cultivo fue de 1700 ml. Después de disgregar las células con un homogeneizador celular Manton-Gaulin, se efectuó la centrifugación a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado. Se suspendió el precipitado en 2000 ml de agua desionizada, se centrifugó a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos y se recuperó el precipitado. Se suspendió el precipitado obtenido en 2000 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM, 1% de Triton-X y se recuperó el precipitado por centrifugación a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos.

Se suspendió el precipitado en 2000 ml de agua desionizada, se centrifugó a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos y se recuperó el precipitado. Se repitió el mismo procedimiento, obteniéndose 26 g de precipitado. Se suspendió este en 26 ml de agua desionizada y se almacenó a -20°C hasta su uso como suspensión de cuerpos de inclusión ($DO_{660} = 250$, 45 ml). Las células W3110 M25 que expresan la variante OmpT D97M de proteasa OmpT completaron el cultivo a las 20 horas después del inicio, y el volumen de cultivo fue de 2100 ml. Se centrifugó el cultivo a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos, obteniéndose un precipitado. Se suspendió el precipitado en 2000 ml de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM), se centrifugó a 4°C, 6000 x g durante 10 minutos y se recuperó el precipitado. Se repitió este mismo procedimiento y se recuperaron 311 g de precipitado. Se suspendió el precipitado en agua desionizada y se almacenó a -20°C hasta su uso como suspensión celular ($DO_{660} = 320$, 390 ml).

(2) Escisión de la proteína de fusión PMT de cuerpos de inclusión por células W3110/M25 que expresan la variante OmpT D97M de proteasa OmpT

Después de añadir 1 ml de fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) y 0,8 ml de EDTA 50 mM a 8 ml de urea 10 M, se añadieron 4 ml de cuerpos de inclusión de proteína de fusión PMT ($DO_{660} = 250$) para la lisis de los cuerpos de inclusión. A continuación, se añadieron a los mismos 5,2 ml de agua, se añadió adicionalmente 1 ml de suspensión de células W3110 M25 que expresan la variante OmpT D97M de proteasa OmpT ($DO_{660} = 320$) preparada en (1) anteriormente y se inició la reacción a un volumen de mezcla de reacción de 20 ml. Se llevó a cabo la reacción agitando durante 60 minutos a 25°C y 120 rpm. Después de 60 minutos, se añadieron 40,5 ml de ácido acético 20 mM (pH 4,0) a 13,5 ml de mezcla de reacción (correspondiente a los cuerpos de inclusión en una porción de 100 ml de cultivo de células W3110 M25 productoras de proteína de fusión de motilina PMT) y se efectuó una centrifugación a 4°C, 20.000 x g durante 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante. Este procedimiento eliminó prácticamente toda la proteína de fusión no reaccionada, péptido protector y proteínas derivadas de *E. coli*.

A continuación, se añadió ácido acético 20 mM (pH 4,0) al sobrenadante a un volumen de 200 ml y se suministró la mezcla para la siguiente purificación. Se añadió entonces ácido acético 20 mM (pH 4,0) al sobrenadante para reducir el pH, para permitir la adsorción en la cromatografía de intercambio catiónico descrita a continuación. La Fig. 8 muestra los resultados de observar el cambio dependiente del tiempo de la liberación de motilina hasta 120 minutos en las mismas condiciones, para determinar el tiempo de reacción para la liberación de motilina. Se muestran en las Fig. 9A y B los resultados del análisis de HPLC y PAGE-SDS de la escisión de la proteína de fusión 60 minutos después del inicio de la reacción. Como se demuestra por la PAGE-SDS, la proteína de fusión PMT se había escindido casi completamente a los 60 minutos después del inicio de la reacción, deteniendo así esencialmente el aumento de la liberación de motilina. Por lo tanto, se estableció el tiempo de reacción como 60 minutos.

Se detectó no solo motilina humana producida mediante escisión en Arg¹⁴³-Phe¹⁴⁴, sino también un polipéptido (RRAR-motilina) producido por escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰. En la PAGE-SDS, se observó RRAR-motilina con una banda más concentrada que la motilina humana (Fig. 9B), pero los resultados del análisis de HPLC contradicen esto, indicando un mayor área de pico de motilina humana que de RRAR-motilina, y por tanto una mayor cantidad (Fig. 9A). Se supuso que esto era debido a que la RRAR-motilina se tiñe más fácilmente que la motilina humana en PAGE-SDS. Por tanto, se cree que las densidades de banda son correctas como resultados de PAGE-SDS y que no reflejan las relaciones en volumen.

(3) Purificación de motilina

Se aplicó una porción de 200 ml de sobrenadante a SP-Sepharose Fast Flow (27 mL, Ø26 mm x 50 mm) de Amersham Pharmacia equilibrada previamente con ácido acético 20 mM (pH 4,0). A continuación, se efectuó un lavado mediante circulación de ácido acético 20 mM (pH 4,0), ácido acético 20 mM (pH 4,0) y NaCl 0,1 M a 100 ml cada uno. Se efectuó la elución mediante circulación de 200 ml de ácido acético 20 mM (pH 4,0) a un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,5 M. El caudal para la cromatografía de intercambio catiónico fue de 5 ml/min en todos los casos. Se expidieron las fracciones de elución en porciones de 5 ml y, basándose en los resultados del análisis de HPLC, se seleccionaron y agruparon las fracciones. Fue así posible retirar el polipéptido producido mediante la escisión de la proteína de fusión PMT en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰.

Se suministraron los conjuntos a una Vydac 214TPB1520 (24 ml, Ø10 mm x 300 mm) que se había equilibrado previamente con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Se efectuó un lavado mediante circulación con 100 ml de TFA al 0,1% y se llevó a cabo la elución mediante circulación con 200 ml de TFA al 0,1% con un gradiente lineal de acetonitrilo de 0-30%. El caudal para la cromatografía en fase inversa fue de 1,6 ml/min en todos los casos. Se expidieron las fracciones eluidas en porciones de 4 ml y, basándose en los resultados del análisis de HPLC, se seleccionaron y agruparon las fracciones. Se muestran en la Tabla 3 los resultados de la purificación.

Tabla 3. Resultados de purificación de motilina humana

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Motilina humana (mg/ml)	Motilina humana (mg)	Rendimiento (%)	Pureza (%)
Reacción	13,5	2,32	31	100	5,87
Precipitado ácido	200	0,159	32	100	48,8
Intercambio catiónico	40,0	0,591	24	77	94,2
Fase inversa	22,5	0,696	16	52	>99,0

Purificación usando cuerpos de inclusión correspondientes a 0,1 l de disolución de cultivo de W3110 M25 PMT

Los resultados del análisis de HPLC, análisis de masas y análisis de aminoácidos N-terminales de la muestra obtenida mediante esta purificación coincidían con los de la motilina humana. La purificación demostró que es posible obtener 160 mg de motilina humana con $\geq 99,0\%$ de pureza con un rendimiento de 52% por 1 l de cultivo de células W3110 M25 productoras de la proteína de fusión de motilina PMT.

Ejemplo 16. Liberación de polipéptido fisiológicamente activo a partir de proteína de fusión usando variante de proteasa OmpT

Para examinar si puede liberarse o no un polipéptido fisiológicamente activo distinto de motilina humana a partir de una proteína de fusión usando una variante de proteasa OmpT, se construyó un plásmido que tenía la estructura mostrada en la Fig. 10A, que expresa la proteína de fusión PAC de hormona adrenocorticotrópica humana (1-24), y la proteína de fusión PCT precursora de calcitonina humana mostrada en la Fig. 11, y se preparó cada proteína de fusión como cuerpos de inclusión a partir de transformantes que se transfirieron cada uno a W3110 M25. Se hicieron reaccionar con membrana externa de *E. coli* W3110 M25 que expresa la variante de proteasa OmpT D97L o D97H durante 10 minutos o 2 horas a 25°C. Como control, se llevó a cabo la reacción para ambas proteínas de fusión usando proteasa OmpT de tipo silvestre. Se muestran los resultados del análisis de HPLC en la Fig. 12.

Se aislaron fragmentos de escisión de cada proteína de fusión mediante HPLC y se sometieron a análisis de masas. Se llevó a cabo la HPLC usando una columna YMC PROTEIN RP a una temperatura de columna de 40°C y un caudal de 1 ml/min. Se efectuó la elución con un gradiente lineal de 10-50% de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% durante 50 minutos, y se monitorizó la absorción a 214 nm. La proteína de fusión PAC se escindía en Arg¹⁴³-Ser¹⁴⁴ por la proteasa OmpT de tipo silvestre, liberando hormona adrenocorticotrópica humana (1-24). Se escindía también en Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹, liberando RAR-ACTH. Aunque no se muestra en la Fig. 12, se produjeron también ACTH(1-15) y ACTH(16-24) mediante escisión en Arg¹⁴³-Ser¹⁴⁴ y Lys¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹. PAC se escindía adicionalmente en Arg¹⁴³-Ser¹⁴⁴ por D97L, liberando hormona adrenocorticotrópica humana (1-24) 2,9 veces más que la proteasa OmpT de tipo silvestre.

No se liberaban subproductos por escisión en otros sitios. La proteína de fusión PCT se escindía en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ y Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ por la proteasa OmpT de tipo silvestre, liberando RRAR-CT y RAR-CT. PCT se escindía en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰, Arg¹⁴¹-Ala¹⁴² y Arg¹⁴³-Cys¹⁴⁴ por D97H, liberando RRAR-CT, AR-CT y precursor de calcitonina humana. Se confirmó la liberación del polipéptido fisiológicamente activo diana por proteasa OmpT de tipo silvestre a partir de todas las proteínas de fusión. Esto demostró que los sistemas de producción de polipéptido fisiológicamente activo que utilizan secuencias polipeptídicas ligadoras y variantes de proteasa OmpT indicados en los ejemplos pueden aplicarse no solo para polipéptidos fisiológicamente activos específicos, y por lo tanto se cree que la utilidad general de este método es considerable.

Ejemplo 17. Coexpresión de la proteína de fusión PMT y la variante de proteasa OmpT D97M

Cuando se expresa una proteína de fusión como cuerpos de inclusión en *E. coli* y las células de *E. coli* hospedadoras expresan proteasa OmpT, aparece escisión por proteasa OmpT simplemente disolviendo los cuerpos de inclusión obtenidos en urea. Se investigó por lo tanto si la motilina humana puede liberarse mediante lisis a partir de cuerpos de inclusión cuando se coexpresan el plásmido pG117S4HompPMT, que expresa la proteína de fusión PMT (véase el Ejemplo 9) y un plásmido que expresa la variante de proteasa OmpT D97M usando *E. coli* W3110 M25 deficientes en proteasa OmpT como células hospedadoras. El plásmido pOmpTD97M que expresa la variante de proteasa OmpT D97M es incompatible debido que tiene el mismo origen de replicación que pG117S4HompPMT.

Se construyó un plásmido que expresa la variante de proteasa OmpT D97M a partir de pMW218 (Fig. 13) de la siguiente manera para permitir la coexpresión. Con el plásmido pOmpTD97M (véase el Ejemplo 11) como molde, se amplificó la región desde el promotor de lactosa al terminador trpA de pOmpTD97M mediante PCR usando cebadores que incluían sitios de endonucleasas de restricción XhoI e HindIII. Después de digerir el fragmento de ADN obtenido con XhoI e HindIII, se insertó un fragmento de ADN obtenido mediante digestión de pMW218 con Sall e HindIII para construir un plásmido que expresa la variante de proteasa OmpT D97M derivado de pMW218. Se transformaron células W3110 M25 productoras de la proteína de fusión de motilina PMT (véase el Ejemplo 9) con el plásmido que expresa la variante de proteasa OmpT D97M derivado de pMW218 mostrado en la Fig. 13.

Se sometió la *E. coli* W3110 M25 recombinante a cultivo giratorio a 37°C durante una noche en un matraz Erlenmeyer de 2 l usando 400 ml de caldo L8 que contenía tetraciclina 10 mg/l y kanamicina 20 mg/l. Se prepararon los cuerpos de inclusión según el protocolo ordinario, excepto porque se efectuó todo el lavado con agua desionizada. Se llevó a cabo la reacción de liberación de motilina humana a partir de los cuerpos de inclusión obtenidos de la siguiente manera. Después de añadir 20 µl de fosfato de sodio 1 M (pH 7,0) y 16 µl de EDTA 50 mM a 160 µl de urea 10 M, se añadieron 80 µl de cuerpos de inclusión de proteína de fusión (DO₆₆₀= 100) para la lisis de los cuerpos de inclusión. Se añadió entonces agua (124 µl) para iniciar la reacción.

Se llevó a cabo la reacción a 25°C y se efectuaron tomas de muestra a 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 1440 minutos después del inicio de la reacción para análisis por PAGE-SDS (Fig. 14). Los resultados del análisis mostraron que una reacción de 1440 minutos, concretamente 24 horas, causaba una digestión prácticamente completa de la proteína de fusión PMT. Esto demostraba que prolongar el tiempo de reacción puede conseguir una digestión completa de la proteína de fusión PMT incluso mediante la simple lisis de los cuerpos de inclusión obtenidos de células de coexpresión, permitiendo así la liberación de motilina humana, aunque no tan rápidamente como cuando se usan células *E. coli* transformadas con el plásmido pOmpTD97M que expresa la variante de proteasa OmpT D97M como en el Ejemplo 15.

Ejemplo 18. Reacción entre las proteínas de fusión PMT, PMT6D y PMT7D y la variante de proteasa OmpT D97M

Aunque los resultados del Ejemplo 14 demostraban que se produce motilina a partir de la proteína de fusión PMT mediante la variante de proteasa OmpT D97M, aparecía también escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰, proporcionando el subproducto RRAR-motilina. Por otro lado, los resultados del Ejemplo 8 indicaban que situar el aminoácido ácido aspártico en posición P3 o P4 cuando no se desea escisión puede inhibir la escisión en esos sitios.

Por tanto, puesto que Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ de la proteína de fusión de motilina PMT es un sitio en que no se desea escisión, se construyeron plásmidos que tenían las estructuras mostradas en la Fig. 10A, que expresan las proteínas de fusión de motilina PMT6D y PMT7D mostradas en la Fig. 15, y se usaron estos para transformar *E. coli* W3110 M25. Se recuperaron las proteínas de fusión como cuerpos de inclusión y se usaron los cuerpos de inclusión para reacción durante 2 horas a 25°C, con proteína de fusión de motilina a una concentración de 4 mg/ml (DO₆₆₀= aproximadamente 20), urea 4 M, EDTA 2 mM, fosfato de sodio 50 mM y variante de proteasa D97M 0,52 mg/ml (DO₆₆₀ = 1). Se midió la concentración de proteína de los cuerpos de inclusión mediante HPLC de la siguiente manera. Se añadieron los cuerpos de inclusión a DO₆₆₀= 1 a ácido acético al 6% y urea 2 M, se centrifugó la mezcla a 10.000 x g durante 3 minutos y se suministraron 50 µl del sobrenadante a una columna YMC PROTEIN RP. Se llevó a cabo la HPLC con una temperatura de columna de 40°C y un caudal de 1 ml/min.

Se efectuó la elución durante 40 minutos con un gradiente lineal de 20-60% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido trifluoroacético, y se monitorizó la absorción a 220 nm. Se detectó la concentración de proteína de los cuerpos de inclusión usando seroalbúmina bovina (BSA) como muestra patrón. Se suministró la suspensión de variante de proteasa OmpT D97M (DO₆₆₀= 0,5) en la fracción de membrana externa de *E. coli* al PAGE-SDS, y se midió la concentración de variante con un densitómetro usando OmpT purificada como muestra patrón. Se muestran en las Fig. 16, 17 y 18 los resultados del análisis de HPLC de cada una de las disoluciones de reacción. La motilina se liberó a 280, 250 y 370 µg/ml a partir de las proteínas de fusión de motilina PMT, PMT6D y PMT7D, respectivamente.

Las Fig. 16-18 muestran también las concentraciones de los subproductos AR-motilina (producido por escisión en Arg¹⁴¹-Ala¹⁴²) y RRAR-motilina (producido por escisión en Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰), en que la concentración de motilina liberada de cada uno se define como 100. Se proporcionaron los subproductos a 2,8 y 33% con PMT (Fig. 16) y a 3,5 y 16% con PMT6D (Fig. 17), y por lo tanto se inhibió particularmente la producción de RRAR-motilina. Tampoco se detectó pico para RRAR-motilina con PMT7D (Fig. 18). Esto coincide con los resultados del Ejemplo 8, demostrando que incluso cuando se usan enzimas variantes de OmpT, situar el aminoácido ácido aspártico en la posición P3 o P4, en que no se desea escisión, puede inhibir la escisión en esos sitios. La motilina se liberó en la mayor cantidad a partir de PMT7D (370 µg/ml), pero esto se atribuyó a una concentración de liberación de motilina aumentada permitida por la falta de subproducto.

Se enumeran a continuación las secuencias aminoacídicas totales básicas de las proteínas de fusión según la invención.

Proteína de fusión PRR (SEQ ID NO: 1; Fig. 1; Ejemplos 1-2, 13)

Secuencia de PRR

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr <u>Arg Arg</u> His His Gly Ser Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

5 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica del péptido 1 de tipo glucagón (7-37) humano (GLP-1(7-37)) y la porción con doble subrayado es el par de aminoácidos básicos (Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹) que es el sitio de escisión de la proteasa OmpT. La proteína protectora (β-gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos N-terminales de β-galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 153.

Proteína de fusión derivada de PA (SEQ. ID NO: 2; Fig 2; Ejemplos 1-2)

Secuencia de PA

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Ala <u>Arg Arg</u> Ala Ala Ala Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

10
15 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica del péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) (GLP-1(7-37)) y la porción con doble subrayado es el par de aminoácidos básicos (Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹) que es el sitio de escisión de la proteasa OmpT. La proteína protectora (β-gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos N-terminales de β-galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 153.

Proteína de fusión derivada de PA3' (SEQ. ID NO: 3; Figs 2-3; Ejemplos 3-6)

Secuencia de PA3'

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Ala <u>Arg Arg</u> Ala <u>Arg Ala</u> Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

5 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica del péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) (GLP-1(7-37)) y las porciones con doble subrayado son los sitios de escisión de la proteasa OmpT (Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴). La proteína protectora (β-gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β-galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 153.

Proteína de fusión derivada de PA23 '(SEQ. ID NO: 4; Fig. 3-4; Ejemplos 5-8)

Secuencia de PA23'

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala <u>Arg Arg Arg</u> Ala <u>Arg Ala</u> Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

10

15 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica del péptido 1 de tipo glucagón humano (7-37) (GLP-1(7-37)) y las porciones con doble subrayado son los sitios de escisión de la proteasa OmpT (Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰, Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ y Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴). La proteína protectora (β-gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β-galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 153.

Proteína de fusión PRMT (SEQ. ID NO: 5; Fig. 5; Ejemplos 9-10, 14)

Secuencia de PRMT

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr <u>Arg Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu</u>	150
<u>Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln</u>	162

5 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica de la motilina humana y la porción con doble subrayado es el sitio de escisión de arginina (Arg¹⁴⁰) correspondiente a la posición P1 de la proteasa OmpT de la proteína de fusión PRR. La proteína protectora (β -gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β -galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 140.

Proteína de fusión PMT (SEQ. ID NO: 6; Fig. 5; Ejemplos 9-10, 14-15, 17-18)

Secuencia de PMT

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr</u>	150
<u>Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln</u>	165

10

En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica de la motilina humana. La proteína protectora (β -gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β -galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 143.

15

Proteína de fusión PAC (SEQ. ID NO: 7; Fig. 11; Ejemplo 16)

Secuencia de PAC

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Ser Tyr Ser Met Glu His Phe</u>	150
<u>Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg Arg Pro Val Lys Val</u>	165
<u>Tyr Pro</u>	167

5 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica de la hormona adrenocorticotrópica humana (1-24). La proteína protectora (β -gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β -galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 143.

Proteína de fusión PCT (SEQ. ID NO: 8; Fig. 11; Ejemplo 16)

Secuencia de PCT

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys</u>	150
<u>Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe</u>	165
<u>Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly</u>	176

10 En esta secuencia aminoacídica, la porción subrayada es la secuencia aminoacídica del precursor de calcitonina humana. La proteína protectora (β -gal117S4H) derivada de los 117 aminoácidos *N*-terminales de β -galactosidasa de *E. coli* consiste en la secuencia aminoacídica desde la metionina en el aminoácido nº 1 a la arginina en el aminoácido nº 127. El péptido ligador consiste en la secuencia aminoacídica desde la glutamina en el aminoácido nº 128 a la arginina en el aminoácido nº 143.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Daiichi Suntory Pharma Co., LTD.
- <120> Método de la escisión de polipéptidos usando variantes de la proteasa OmpT
- <130> P860
- 5 <160> 8
- <210> 1
- <211> 184
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <221>
- <222>
- <223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión PRR
- <400> 1

```

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

```

15

Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

180

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221>

<222>

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión PA

10 <400> 2

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp

1 5 10 15

Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro

20 25 30

Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro

35 40 45

Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe

50 55 60

Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala

65 70 75 80

Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr

85 90 95

Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro

100 105 110

Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln

115 120 125

Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Ala Ala Ala

130 135 140

Ala Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr

145 150 155 160

Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile

165 170 175

Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

180

<210> 3

<211> 184

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>

5 <222>

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión de tipo PA3'

<400> 3

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1           5           10           15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
      20           25           30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
      35           40           45
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
      50           55           60
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65           70           75           80
Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
      85           90           95
Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
      100           105           110
Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
      115           120           125
Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Ala Arg Ala
      130           135           140
Ala Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 145           150           155           160
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
      165           170           175
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
      180

```

<210> 4

10 <211> 184

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>

15 <222>

ES 2 398 463 T3

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión de tipo PA23'

<400> 4

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1           5           10           15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
           20           25           30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
           35           40           45
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
           50           55           60
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65           70           75           80
Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
           85           90           95
Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
           100           105           110
Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
           115           120           125
Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg Ala
 130           135           140
Ala Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 145           150           155           160
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
           165           170           175
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
           180

```

<210> 5

5 <211> 162

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221>

10 <222>

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión de tipo PRMT

<400> 5

ES 2 398 463 T3

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

<210> 6

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221>

<222>

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión de tipo PMT

10 <400> 6

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

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

<210> 7

<211> 167

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<22D

<222>

<223> Secuencia aminoacídica básica de la proteína de fusión de tipo PAC

10 <400> 7

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala

ES 2 398 463 T3

Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
115 120 125
Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg Cys
130 135 140
Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn
145 150 155 160
Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly
165 170

REIVINDICACIONES

1. Un método de escisión de polipéptidos caracterizado porque hay arginina o lisina en la posición P1 de un sitio de escisión deseado en un polipéptido, están situados un solo aminoácido básico o dos o tres aminoácidos básicos consecutivos en cualquier sitio de la secuencia aminoacídica desde la posición P10 a la posición P3 o desde la posición P3' a la posición P5' y se usa proteasa OmpT para escindir el sitio de escisión deseado en dicho polipéptido, en el que:
- 5 (1) la proteasa OmpT es una variante del aminoácido 97 de proteasa OmpT en la que el aminoácido 97 desde el extremo N de la proteasa OmpT es leucina, metionina o histidina; y
- (2) el aminoácido P1' del polipéptido de sustrato es:
- (a) serina o alanina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es leucina,
- 10 (b) fenilalanina, alanina, serina, cisteína o tirosina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es metionina, y
- (c) alanina, valina, isoleucina, metionina, serina, treonina, cisteína o asparagina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es histidina.
2. Un método para producir un péptido diana caracterizado porque se obtiene un péptido diana a partir de una proteína de fusión, siendo el sitio de escisión de la proteína de fusión un sitio de escisión deseado como se define en la reivindicación 1, y comprendiendo un péptido protector cuyo extremo N es arginina o lisina, fusionado con un péptido diana mediante el sitio de escisión deseado que puede escindirse por una variante del aminoácido 97 de proteasa OmpT como se define en la reivindicación 1, en el que se transforman células hospedadoras con un plásmido de expresión que tiene un gen que codifica la proteína de fusión, expresándose dicho gen en dichas células y escindiéndose por dicha proteasa en dicho sitio de escisión, y en el que el extremo N del péptido diana es:
- 15 (a) serina o alanina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es leucina,
- (b) fenilalanina, alanina, serina, cisteína o tirosina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es metionina, y
- 20 (c) alanina, valina, isoleucina, metionina, serina, treonina, cisteína o asparagina cuando el aminoácido 97 de la variante de proteasa OmpT es histidina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende situar dos o tres aminoácidos básicos consecutivos entre las posiciones P10 y P3 del sitio de escisión deseado en el polipéptido o proteína de fusión.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende situar tres aminoácidos básicos consecutivos entre las posiciones P5 y P3 del sitio de escisión deseado en el polipéptido o proteína de fusión.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los aminoácidos básicos son arginina y/o lisina.
6. El método de la reivindicación 5, en el que los aminoácidos básicos son arginina.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia aminoacídica de las posiciones P5 a P1 del sitio de escisión deseado en el polipéptido o proteína de fusión es Arg-Arg-Arg-Ala-Arg.
- 35 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia aminoacídica de las posiciones P7 a P1 del sitio de escisión deseado en el polipéptido o proteína de fusión es Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el péptido diana es un péptido compuesto por entre 22 y 45 residuos aminoacídicos.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en el que el péptido diana es hormona adrenocorticotrópica humana (1-24), motilina o precursor de calcitonina.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que las células hospedadoras son *E. coli*.
12. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende usar como proteasa de escisión células bacterianas que expresan un gen que codifica la variante del aminoácido 97 de la proteasa OmpT.
- 45 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende coexpresar un gen que codifica la variante del aminoácido 97 de la proteasa OmpT y un gen que codifica un polipéptido o proteína de fusión cuya escisión por dicha proteasa es deseada.

Fig.1

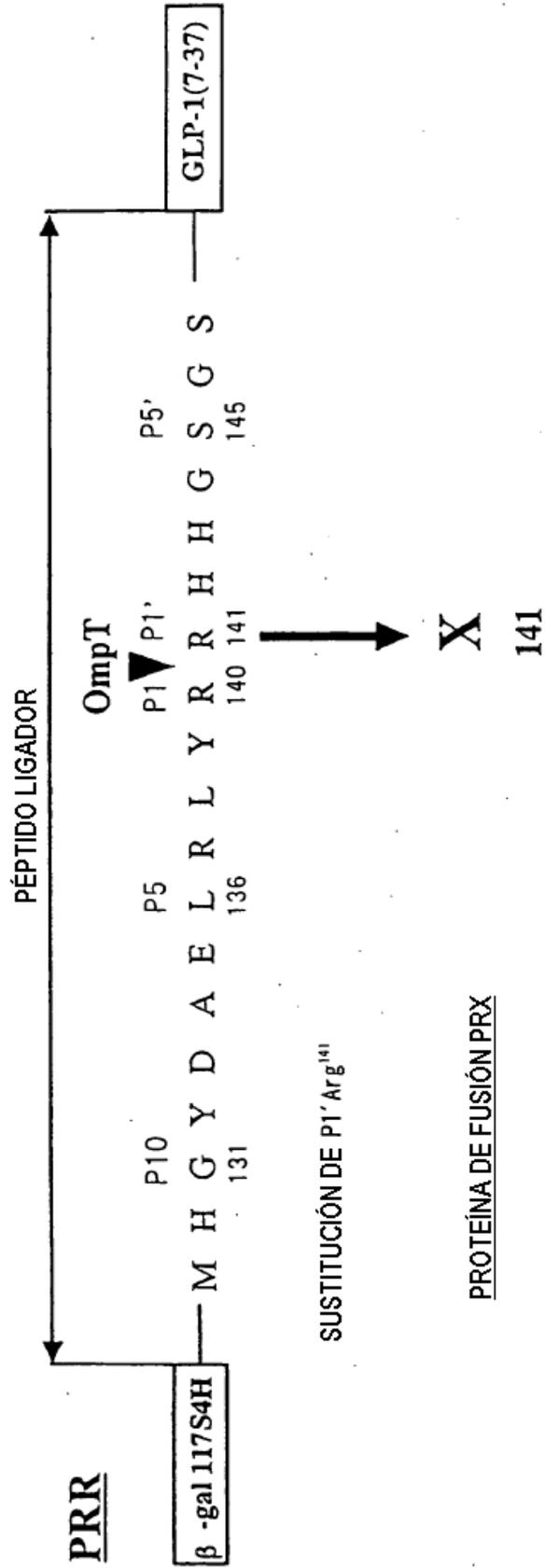


Fig.5

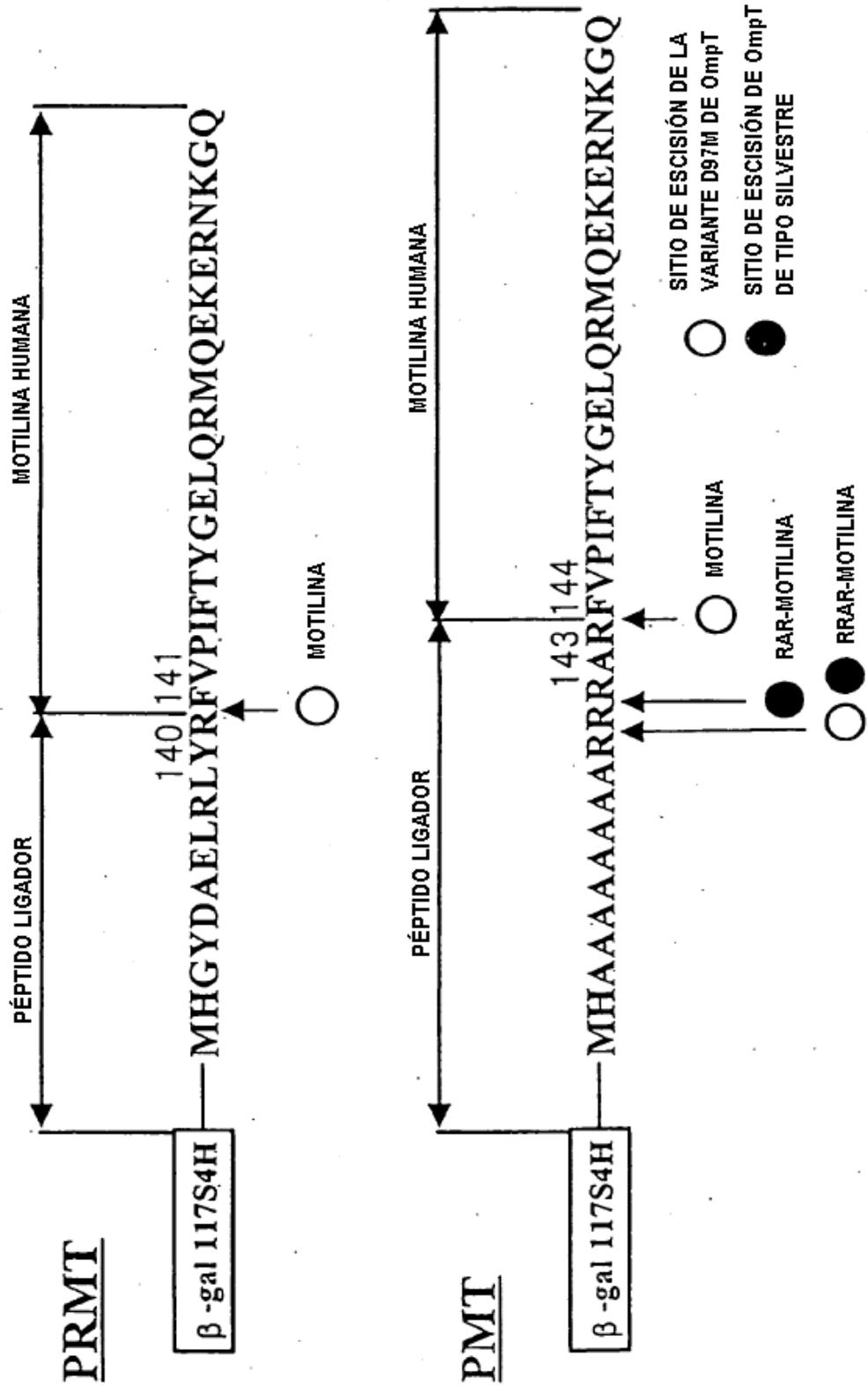
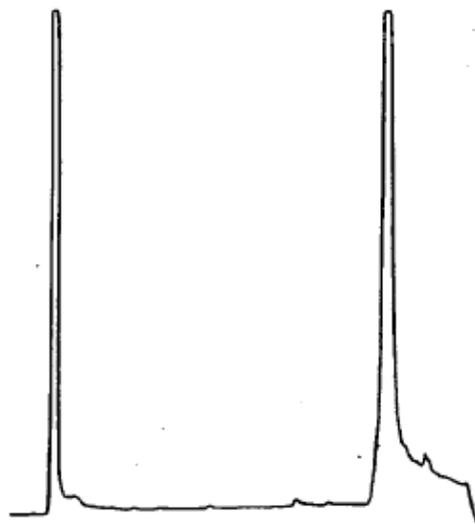
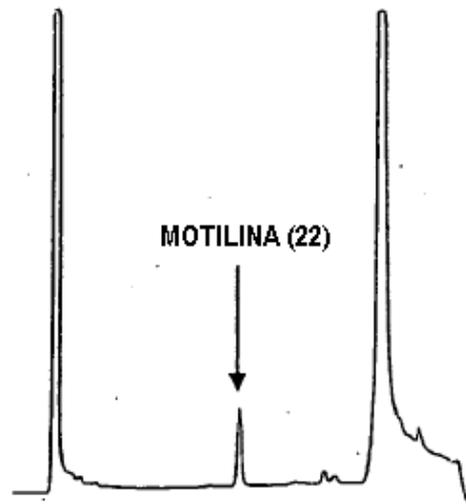


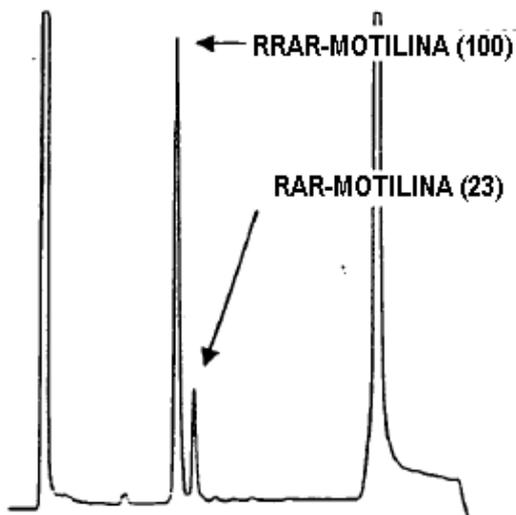
Fig.6



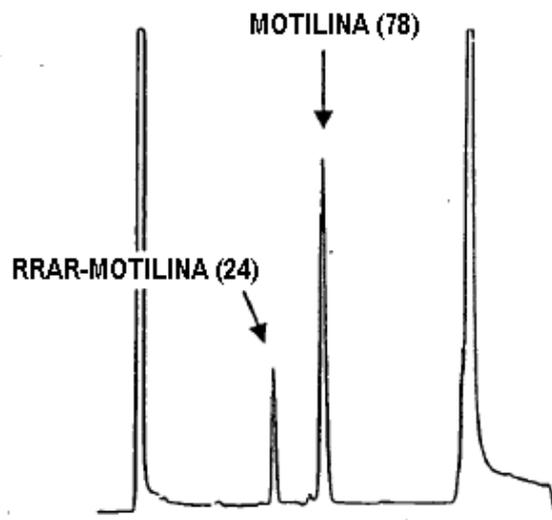
PRMT DE TIPO
SILVESTRE



PRMT
D97M



PMT DE TIPO
SILVESTRE



PMT
D97M

Fig.7

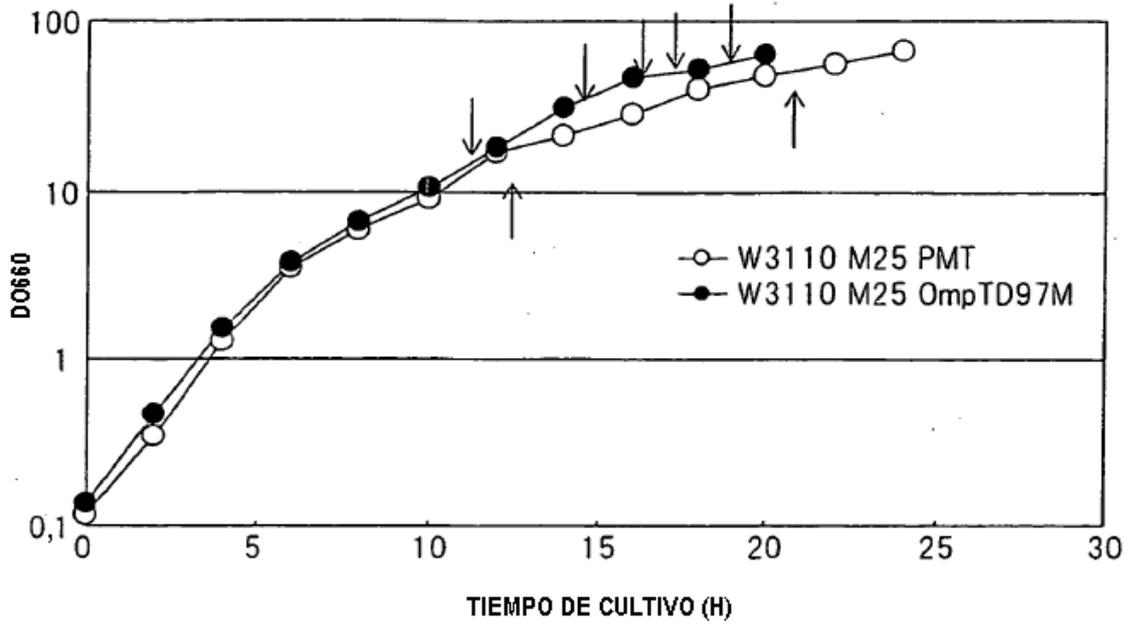


Fig.8

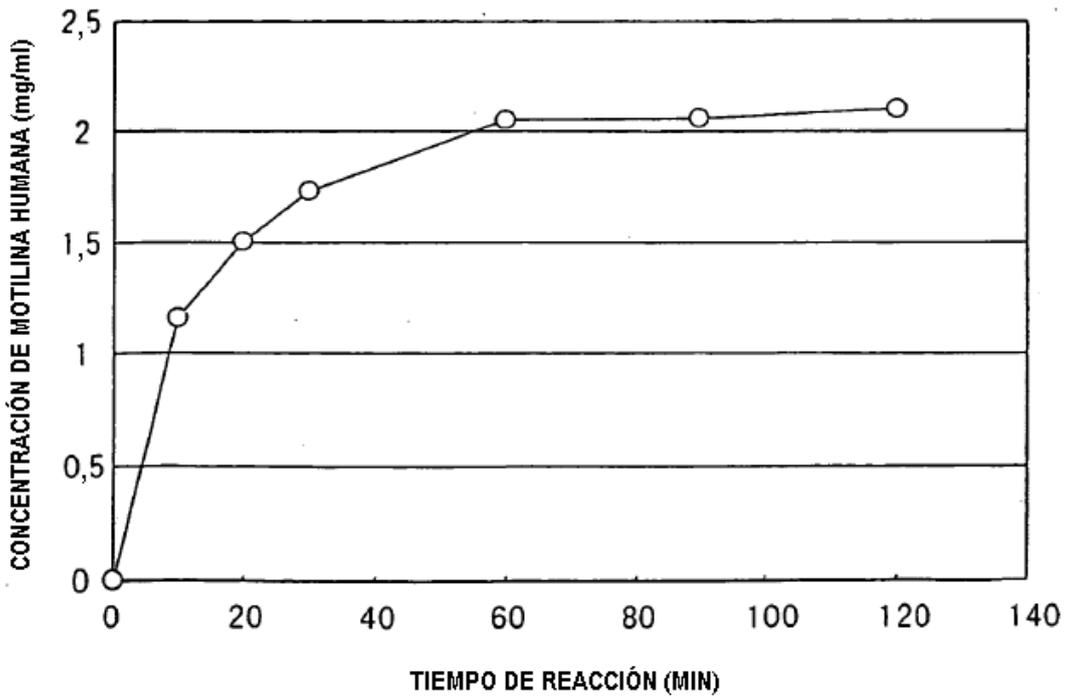


Fig. 9

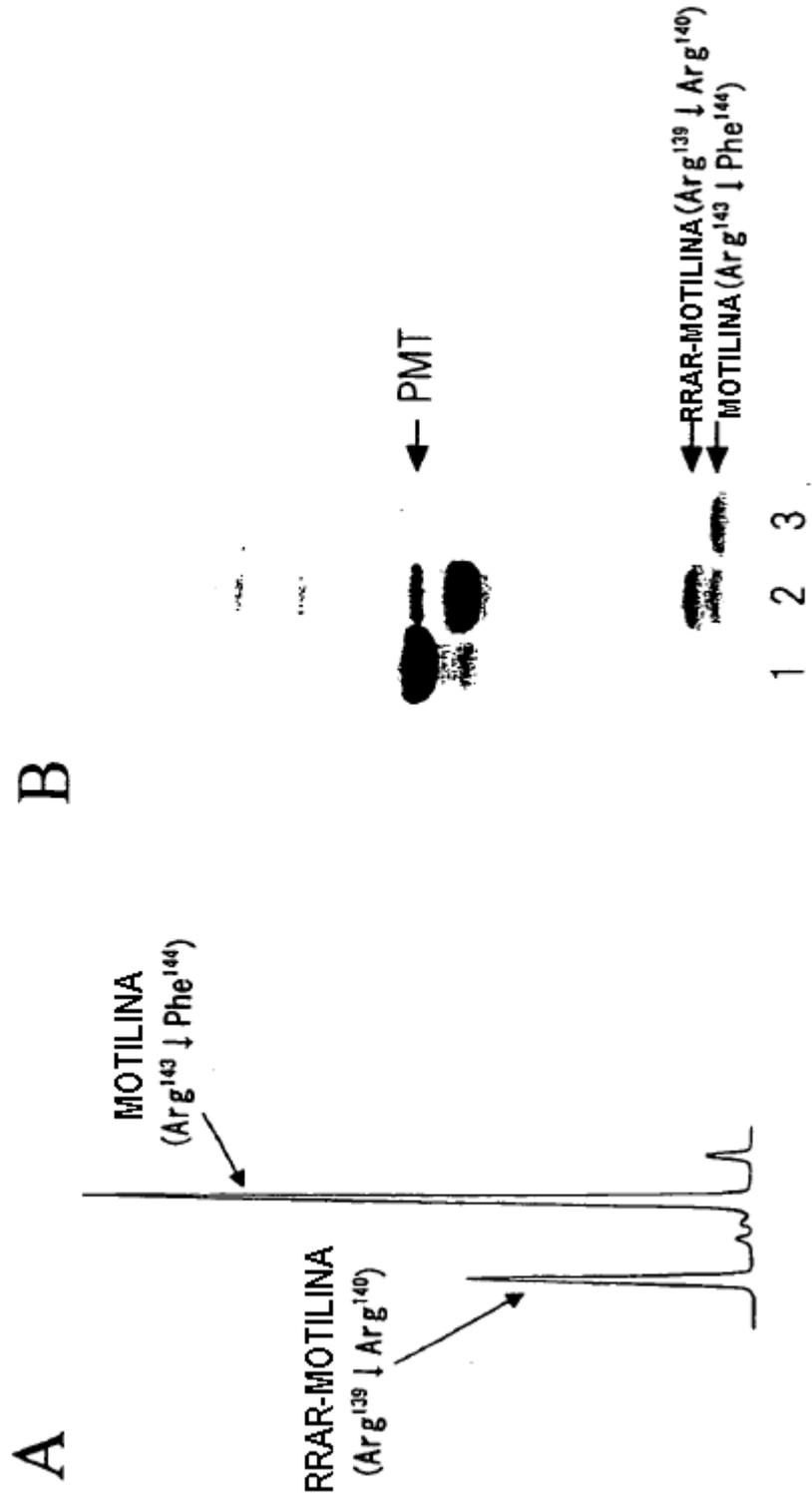


Fig.10

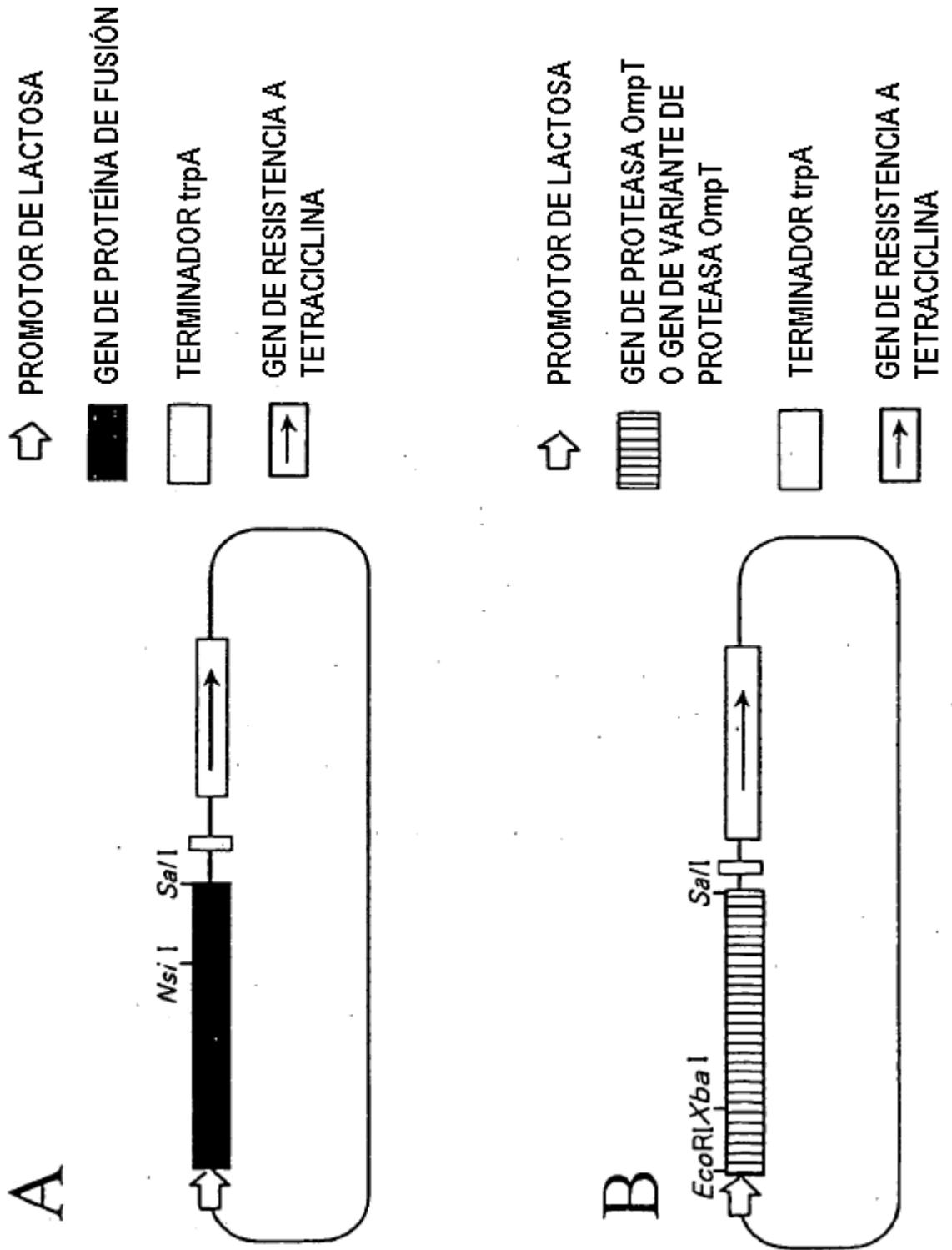


Fig.11

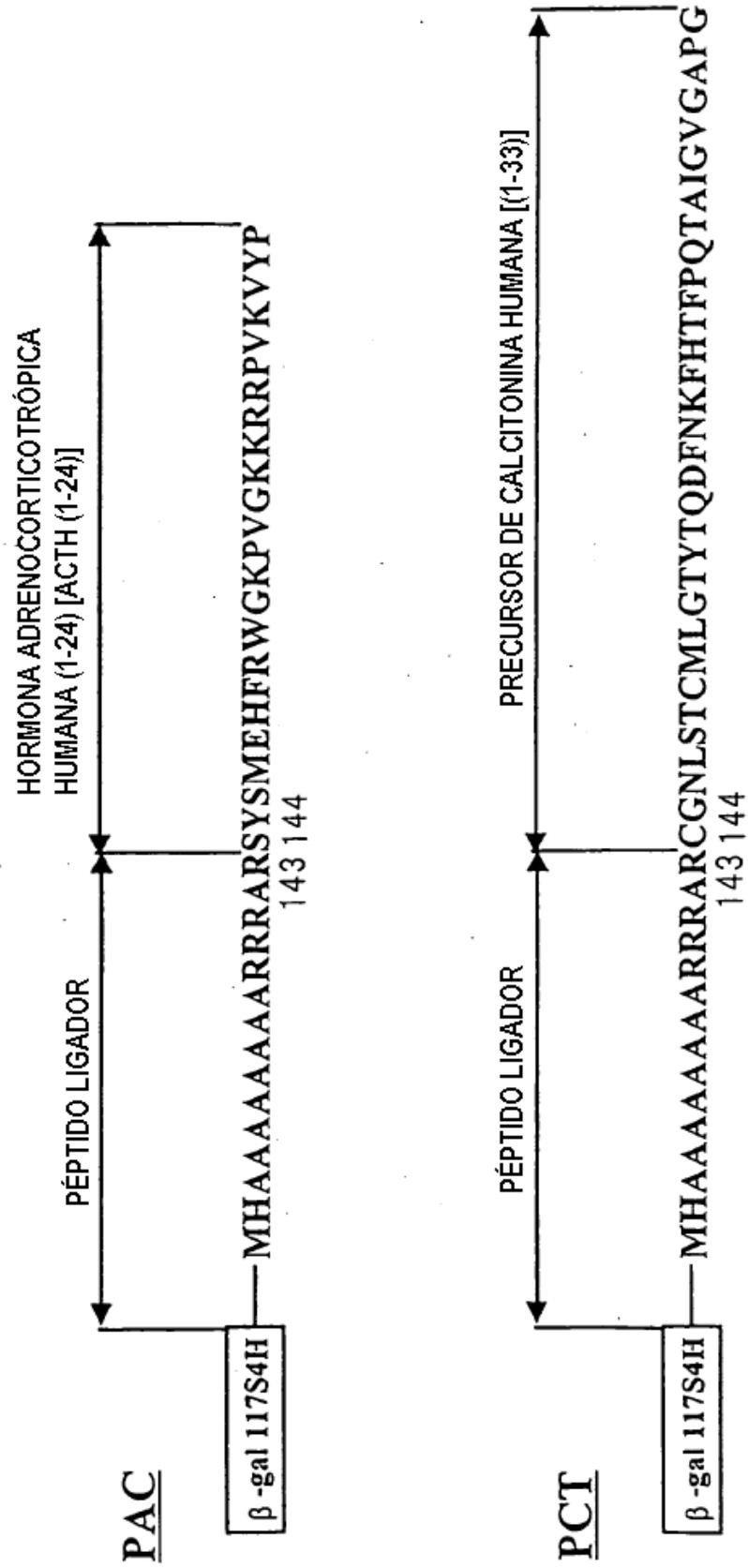


Fig.12

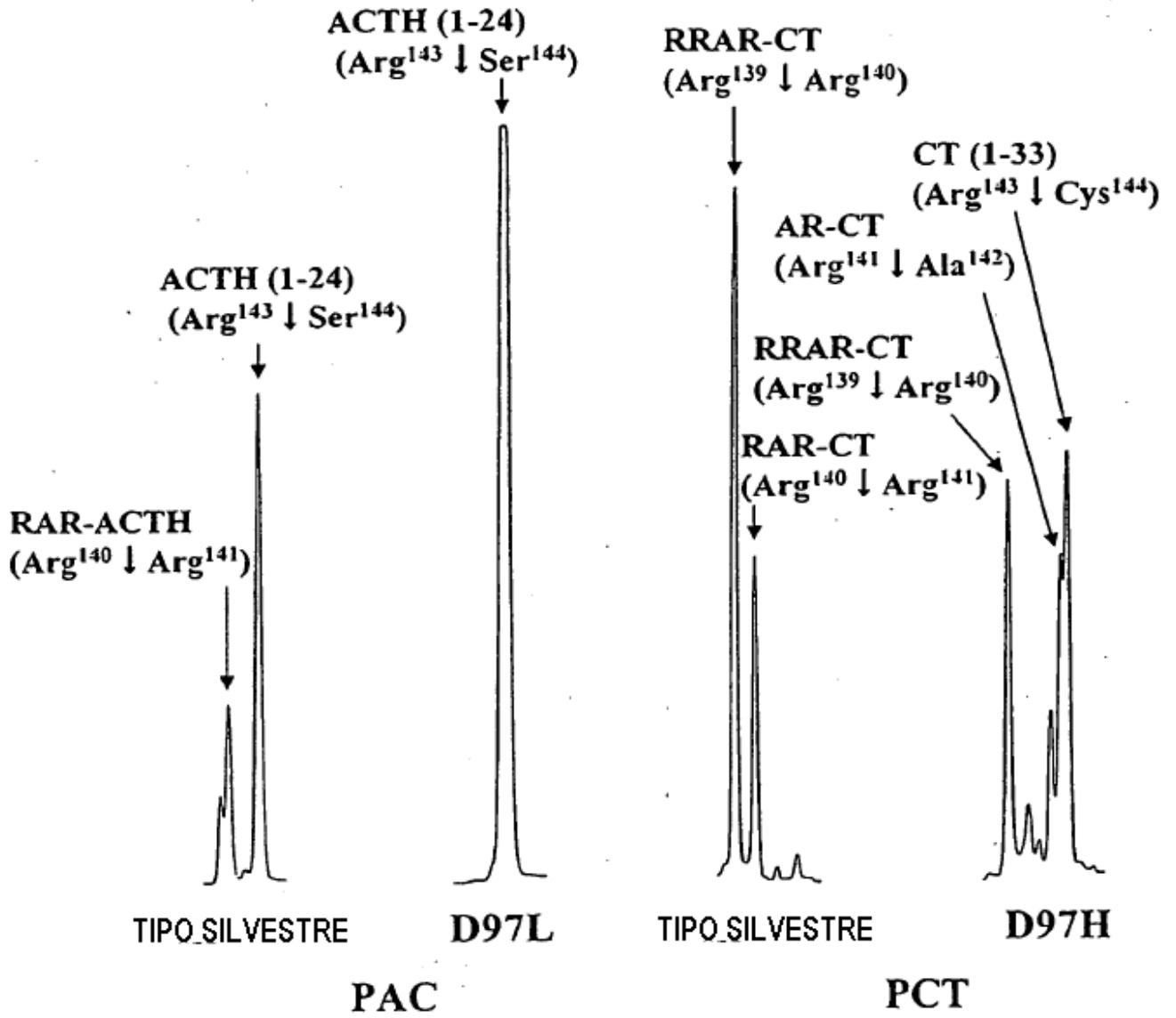


Fig.13

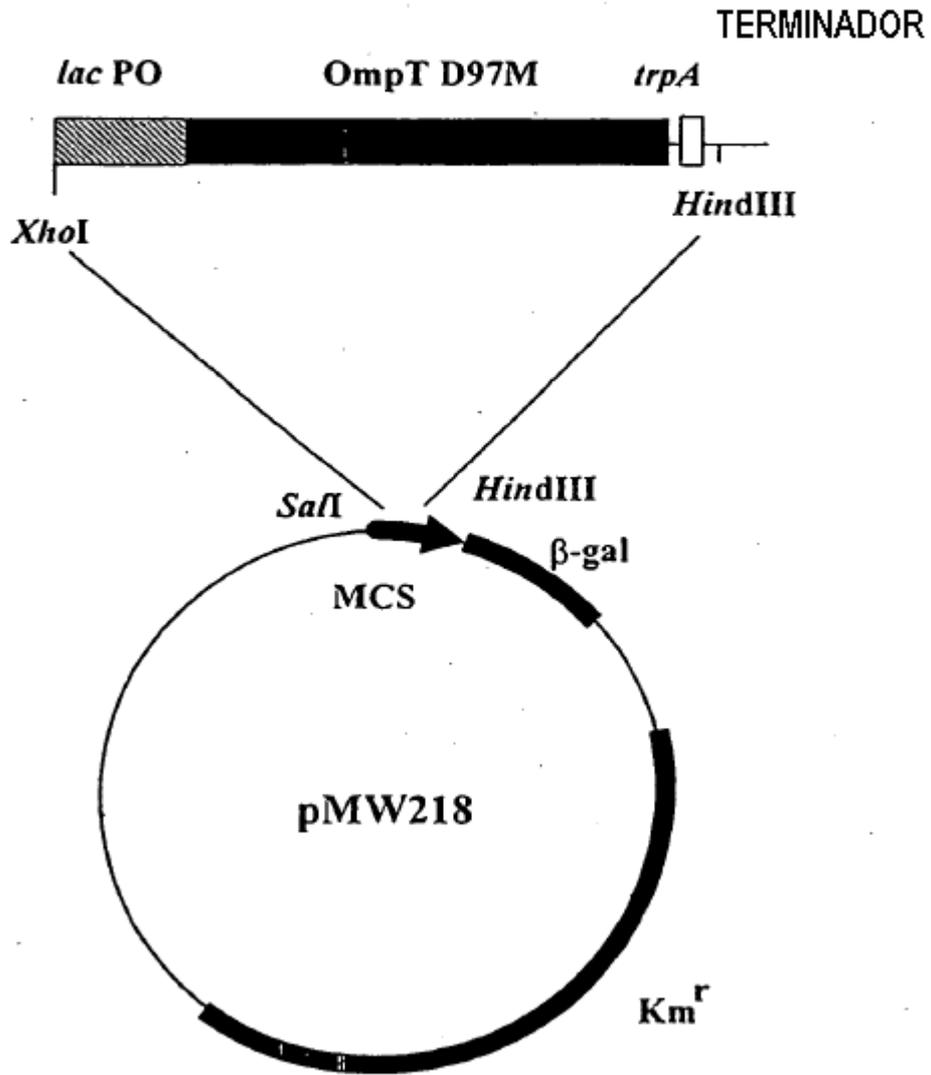


Fig.14

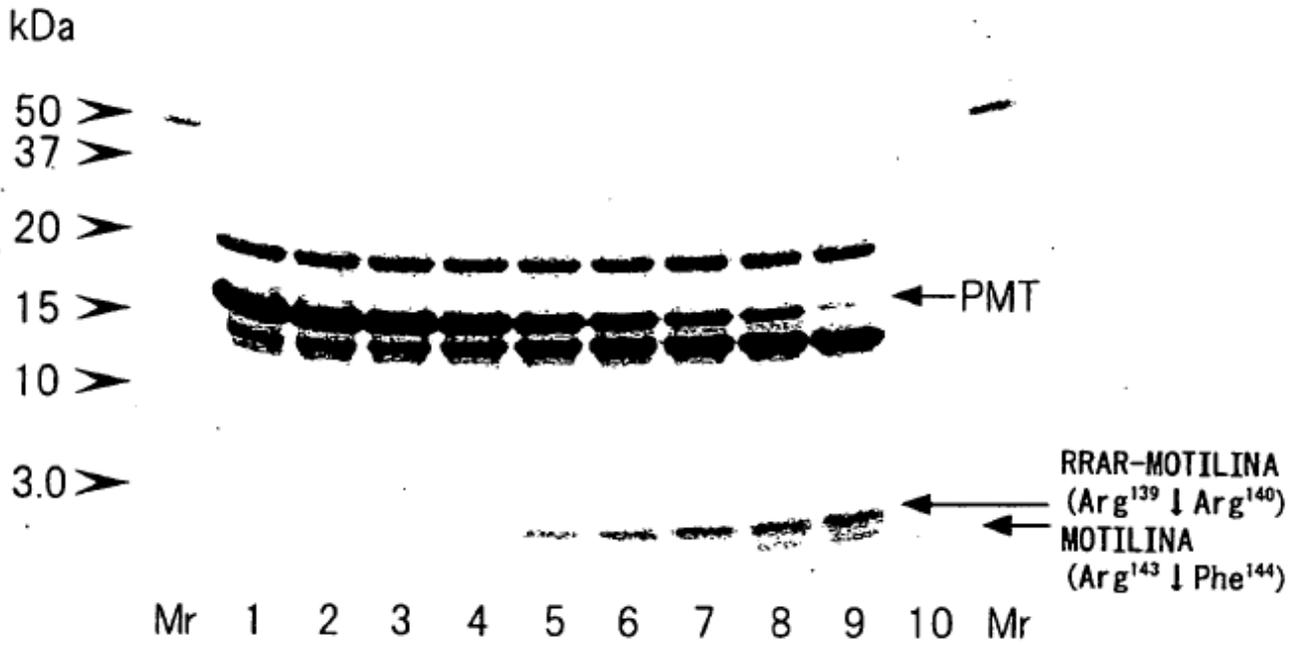


Fig.15

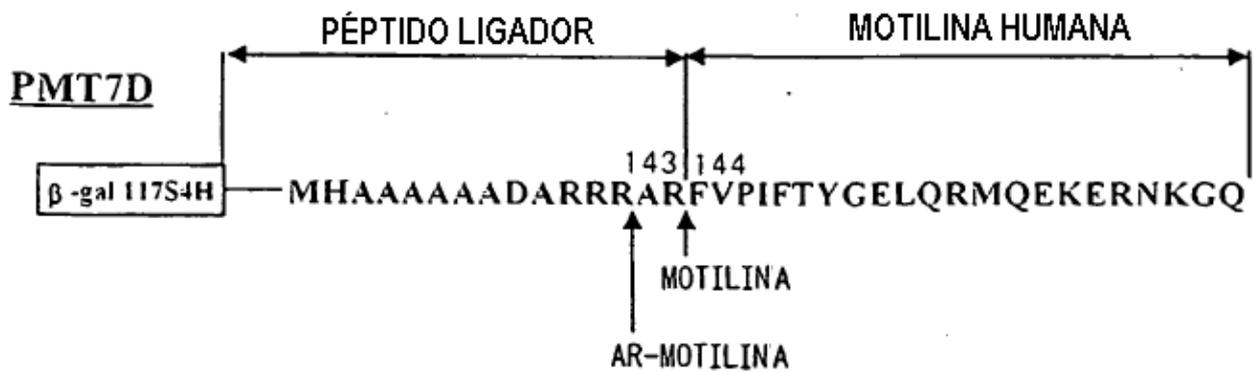
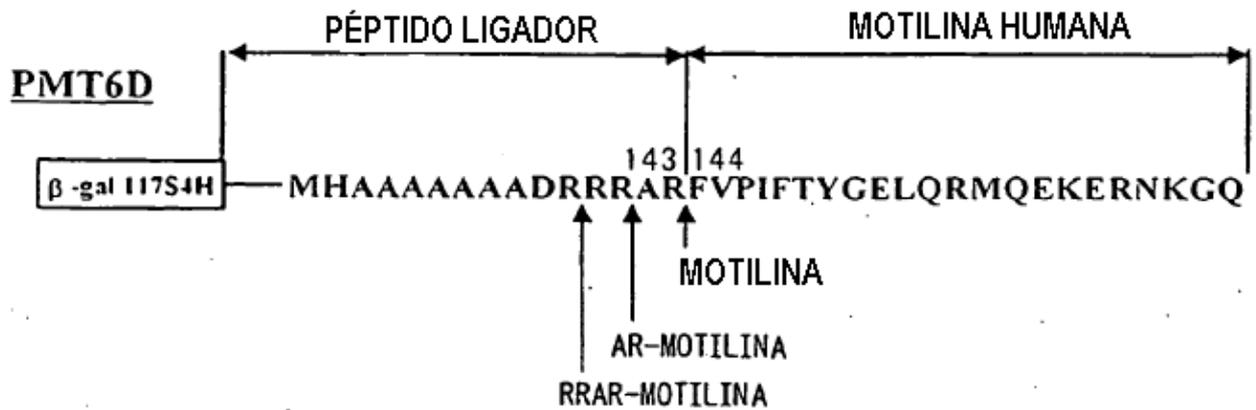
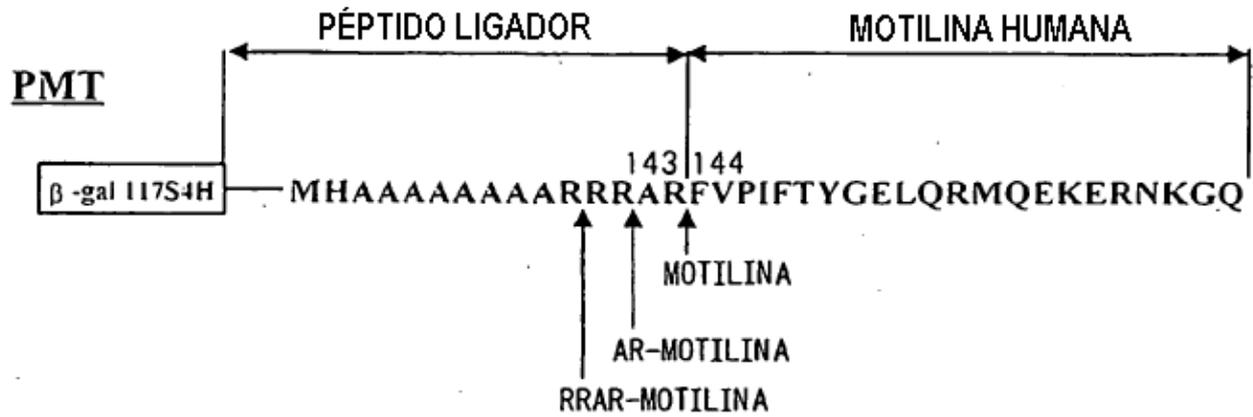


Fig.16.

PMT

MOTILINA 280 μ g/ml

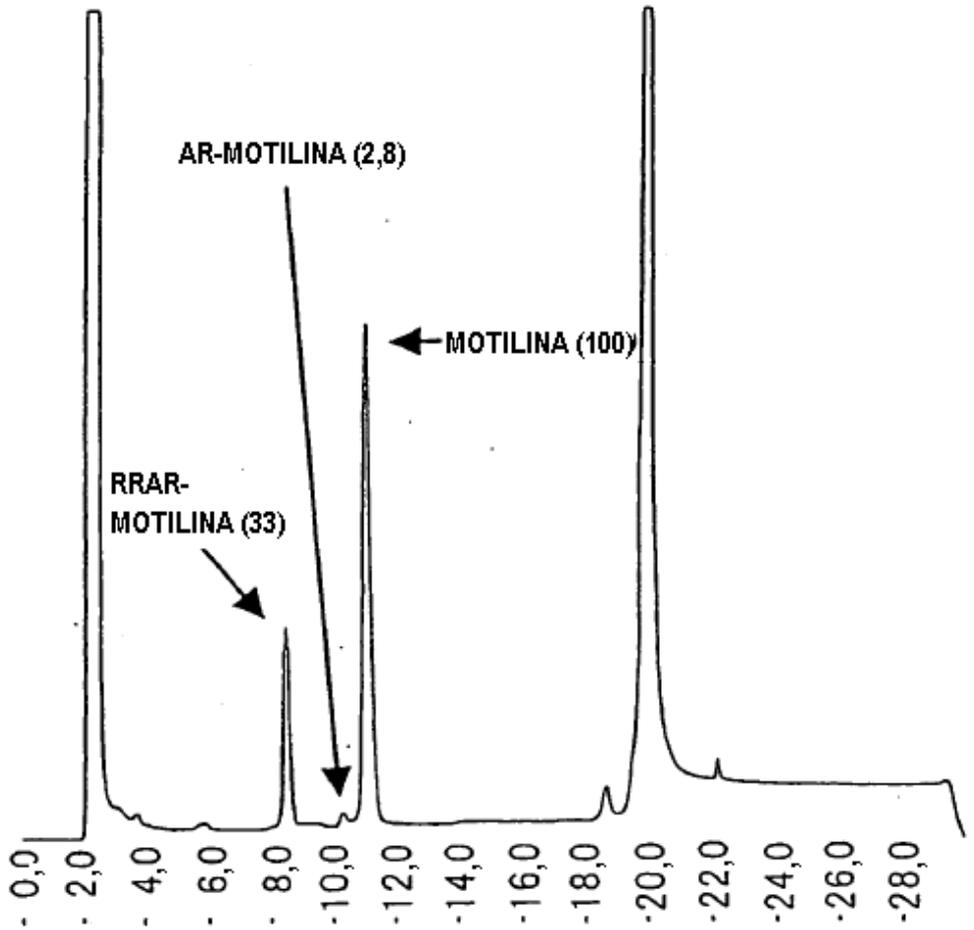


Fig.17

PMT6D

MOTILINA 250 μ g/ml

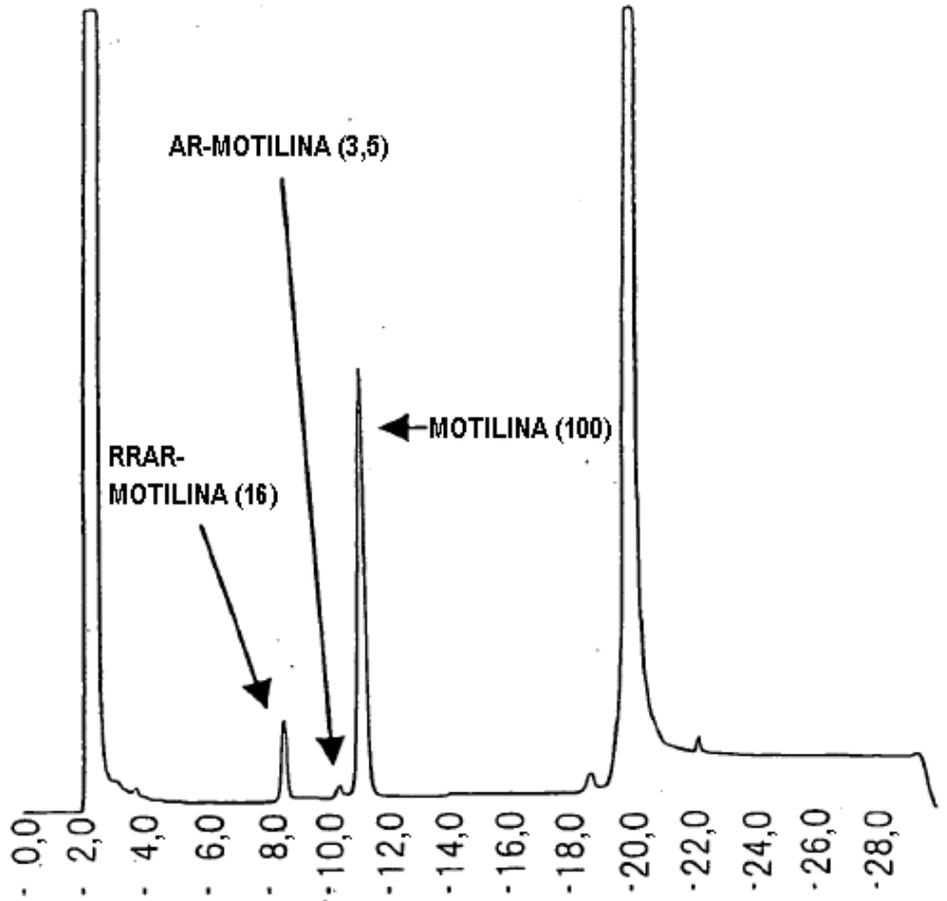


Fig.18

