

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 031**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2006 E 06721223 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 1874932**

54 Título: **Producción de proteínas recombinantes mediante escisión autoproteolítica de una proteína de fusión**

30 Prioridad:

26.04.2005 GB 0508434
26.04.2005 GB 0508435
16.03.2006 GB 0605379

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2013

73 Titular/es:

SANDOZ AG (50.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH y
BOEHRINGER INGELHEIM RCV GMBH & CO KG
(50.0%)

72 Inventor/es:

WERTHER, FLORIAN;
ACHMÜLLER, CLEMENS;
WECHNER, PHILIPP;
AUER, BERNHARD y
PODMIRSEG, SILVIO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 399 031 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

Producción de proteínas recombinantes mediante escisión autoproteolítica de una proteína de fusión

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido heterólogo deseado de interés con un extremo N homogéneo claramente definido en una célula huésped bacteriana, en el que inicialmente un polipéptido de fusión que comprende un derivado de la autoproteasa N^{Pro} de Pestivirus y el polipéptido heterólogo de interés se proporciona mediante la expresión en una célula huésped. El polipéptido heterólogo de interés se produce en la célula huésped en forma de cuerpos de inclusión citoplasmáticos que después se aíslan y tratan de un modo tal que el polipéptido heterólogo deseado se escinde del polipéptido de fusión mediante la actividad autoproteolítica de N^{Pro}.

15 **Antecedentes de la invención**

En la producción de proteínas recombinantes en organismos heterólogos tal como la expresión de proteínas humanas u otras eucarióticas en células bacterianas a menudo es difícil obtener un extremo N definido claramente que es casi 100 % homogéneo según sea posible. Esto se aplica en particular a proteínas farmacéuticas recombinantes cuya secuencia de aminoácidos, en muchos casos, debería ser idéntica a la secuencia de aminoácidos que se produce de forma natural en seres humanos/animales.

Con la expresión natural, por ejemplo en seres humanos, muchas proteínas farmacéuticas que están en uso para terapia también se transportan al espacio extracelular. Una secuencia señal está presente en la proteína precursora para este fin y la escisión de esta secuencia señal tiene como resultado un extremo N claramente definido. Por varios motivos, dichos extremos N homogéneos no siempre son fáciles de producir, por ejemplo en células bacterianas.

Para la producción a escala industrial, muchas proteínas farmacéuticas se producen en el citoplasma de células bacterianas (p. ej., *Escherichia coli*). En estas células huésped, las proteínas farmacéuticas se acumulan en cantidades adecuadas y a menudo se depositan como cuerpos de inclusión insolubles (Bis) dentro de la célula. Estos CI tienen grandes ventajas en el procesamiento y purificación de la proteína diana. Además, la proteína expresada en forma de CI está protegida de la degradación por proteasas mediante proteasas intracelulares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cuerpos de inclusión" hará referencia a agregados que contiene polipéptidos heterólogos presentes en el citoplasma de células huésped transformadas. Estos aparecen como manchas brillantes bajo el microscopio y se pueden recuperar mediante separación del citoplasma.

No obstante, la producción de material IB requiere replegamiento *in vitro* de la proteína expresada. Esto puede, en muchos casos, efectuarse mediante procedimientos conocidos por sí mismos.

Solo en casos raros es adecuada la exportación de la proteína diana al periplasma bacteriano con la ayuda de una secuencia señal pro o eucariótica. Dada la baja capacidad de transporte de la maquinaria de exportación bacteriana, normalmente solo es posible acumular cantidades muy pequeñas del producto.

No obstante, el citoplasma bacteriano difiere considerablemente del espacio extracelular de los eucariotas. Una diferencia es que dentro del citoplasma bacteriano predominan las condiciones reductoras; asimismo se carece de un mecanismo para escindir las secuencias líder en N terminal para formar proteínas maduras. La síntesis de todas las proteínas citoplásmicas comienza con una metionina que se especifica mediante el codón de iniciación adecuado (ATG= inicio de la traducción). Esta metionina en N-terminal se conserva en muchas proteínas, mientras que en otras es escindida por la metionina aminopeptidasa (MAP) presente en el citoplasma e intrínseca al huésped. La eficiencia de la escisión depende esencialmente de dos parámetros. 1. La naturaleza del aminoácido siguiente y 2. La localización del extremo N en la estructura tridimensional de la proteína. La metionina en N-terminal se elimina, preferentemente, cuando el aminoácido siguiente es serina, alanina, glicina, metionina o valina y cuando el extremo N está expuesto, es decir no "escondido" dentro de la proteína. Si el aminoácido siguiente es uno diferente, en particular uno cargado (ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina) o si el extremo N se localiza dentro de la proteína, en la mayoría de los casos, la escisión de la metionina en N-terminal no se produce.

Incluso si un aminoácido que estimula la escisión está presente en la posición 2, la escisión rara vez se completa. Es normal que una proporción no poco considerable (1 – 50 %) de la proteína diana permanezca no afectada por la MAP.

Esta falta de homogeneidad o desviación con respecto a la secuencia natural es, sin embargo, inaceptable en muchos casos porque estos productos con frecuencia muestran diferentes propiedades inmunológicas (por ejemplo, inducción de formación de anticuerpos) y farmacológicas (semivida, farmacocinética). Por estos motivos, es necesario, en la mayoría de los casos, producir un producto idéntico natural (homogéneo y sin aminoácidos extraños

en el extremo N). En el caso de la expresión citoplásmica, aquí, en la mayoría de los casos el remedio es condensar una secuencia de escisión (líder) para una endopeptidasa específica (por ejemplo, factor Xa, enteroquinasa, endopeptidasas KEX, IgA proteasa) o aminopeptidasa (por ejemplo, dipeptidilaminopeptidasa) al extremo N de la proteína diana. No obstante, esto hace que se necesite una etapa adicional durante el procesamiento posterior, el denominado procesamiento cadena abajo de la proteína con gastos en costes y materiales. Además, en presencia de CI, en muchos casos hay interferencia, o incluso prevención completa, del repliegamiento por la secuencia líder.

Los polipéptidos de fusión que comprenden la autoproteasa N^{Pro} de Pestivirus son especialmente útiles a este respecto. La autoproteasa N^{Pro} de Pestivirus siempre escinde la pareja de fusión en un sitio claramente determinado, liberando un polipéptido de interés con un extremo N homogéneo. Además, la actividad autoproteolítica de N^{Pro} puede inducirse in vitro mediante la aplicación de tampones especiales de modo que se pueda obtener el polipéptido de interés mediante escisión de los polipéptidos de fusión que se expresan en CI.

Los pestivirus son pequeños virus con cubierta con un genoma que actúa directamente como ARNm y que tiene un tamaño de 12,3 kb y del cual se transcriben productos génicos virales en el citoplasma. Esto tiene lugar en forma de una poliproteína sencilla que comprende aproximadamente 4.000 aminoácidos y que se degrada mediante proteasas tanto virales como celulares en aproximadamente 12 proteínas maduras.

Los Pestivirus comprenden las subclases CSFV (virus clásico de la fiebre porcina), BDV (virus de la enfermedad de la frontera) y BVDV (virus de la diarrea vírica bovina).

N^{Pro} es una autoproteasa con una longitud de 168 aminoácidos y un Mr aparente de aproximadamente 20.000 (*in vivo*). Es la primera proteína en la poliproteína de Pestivirus y sufre escisión autoproteolítica a partir de la siguiente proteína C de la nucleocápside. Esta escisión tiene lugar tras el último aminoácido en la secuencia de N^{Pro}, Cys168.

El uso de la autoproteasa N^{Pro} natural de Pestivirus para la producción de polipéptidos heterólogos de interés puede, no obstante, estar limitado, ya que la activación de la función autoproteolítica de N^{Pro} in vitro es susceptible únicamente en condiciones específicas de renaturalización. Estas condiciones que permiten la actividad de escisión de N^{Pro} in vitro son inhibitorias para ciertas otras interacciones que son necesarias o deseables en algunos contextos para la producción de polipéptidos heterólogos de interés. Como ejemplo de dichas interacciones se pueden nombrar ciertas afinidades bioespecíficas como, por ejemplo, afinidad selectiva de péptido-proteína. También debido a otros requisitos de parámetros, ciertos procesos no permiten crear las condiciones de renaturalización favorables para N^{Pro} y, como resultado, N^{Pro} no se puede usar en estos procesos. Por tanto, la N^{Pro} natural de Pestivirus puede ser inadecuada para la producción de ciertos polipéptidos de interés y para usar en ciertas condiciones. De acuerdo con esto, existe la necesidad de una N^{Pro} de Pestivirus con mejores propiedades con el fin de potenciar la eficiencia de la escisión, para obtener mayores rendimientos del polipéptido de interés y con el fin de poder usar N^{Pro} en un abanico más amplio de condiciones, que permitan la aplicación de nuevos procesos de producción.

Los documentos WO 01/11057 A y WO 01/11056 A divulgan procedimientos para producir la proteína recombinante usando N^{Pro}. Ruemenapf y col., (J. Virol., 72 (1998): 2544-2547) divulgan mutantes de N^{Pro} de CSFV para identificar residuos implicados en la actividad catalítica.

Sumario de la invención

Dentro de la presente invención, sorprendentemente se ha descubierto que ciertos derivados de la autoproteasa natural N^{Pro} de Pestivirus, que tiene un pl menor y mayor solubilidad son adecuados para usar en un abanico más amplio de condiciones. Además, sorprendentemente se encontró que estos derivados tenían mejor actividad autoproteolítica in Vitro.

De acuerdo con esto, dentro del alcance de la presente invención se proporciona un proceso mejorado para la producción de polipéptidos heterólogos de interés con extremos N homogéneos, que hace uso de los derivados de la autoproteasa N^{Pro} de Pestivirus.

Los derivados de acuerdo con la presente invención se definen en la reivindicación 1; realizaciones preferidas de los mismos se definen en las reivindicaciones 2 a 21. El procedimiento y el uso de estas autoproteasas N^{Pro} de CSFV que tienen actividad autoproteolítica en este procedimiento se definen en las reivindicaciones 22 a 23.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido heterólogo de interés, que comprende

- (i) cultivo de una célula huésped bacteriana que se transforma con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, comprendiendo el polipéptido de fusión la autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en la que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa natural N^{Pro} de CSFV seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituida por un residuo de ácido

glutámico, y un segundo polipéptido, que está conectado con el derivado en el extremo C del derivado de un modo tal que el segundo polipéptido es capaz de ser escindido del polipéptido de fusión mediante la actividad autoproteolítica de la autoproteasa, y siendo el segundo polipéptido un polipéptido heterólogo, en el que el cultivo se produce en condiciones que causan la expresión del polipéptido de fusión y la formación de los correspondientes cuerpos de inclusión citoplasmática,

(ii) aislamiento de los cuerpos de inclusión de la célula huésped,

(iii) solubilización de los *cuerpos de inclusión* aislados,

(iv) inducción de escisión autoproteolítica del polipéptido heterólogo del polipéptido de fusión, y

(v) aislamiento del polipéptido heterólogo escindido,

Una autoproteasa N^{Pro} de pestivirus de acuerdo con la presente invención es la autoproteasa N^{Pro} de CSFV, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 1:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTTL
RDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFCEVTKRIGRVTG
SDGKLYHIYVCVDGCILLKLA KRGT PRTLKWIRNFTNCPLWVTSC-(168)

Dentro de la presente invención, la secuencia anterior está mutada con el fin de generar polipéptidos de fusión con mejores propiedades, comprendiendo los polipéptidos de fusión una autoproteasa N^{Pro} de pestivirus en al que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa natural N^{Pro} de CSFV seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituida por un residuo de ácido glutámico, y un segundo polipéptido, que está conectado con dicho derivado en su extremo C de un modo tal que el segundo polipéptido es capaz de ser escindido del polipéptido de fusión mediante la actividad autoproteolítica del derivado de la autoproteasa, siendo dicho segundo polipéptido un polipéptido heterólogo.

De acuerdo con ello, la presente invención se refiere a derivados tales que la N^{Pro} de Pestivirus natural, que se usan en el procedimiento de la presente invención como parte N-terminal de la proteína de fusión. Los derivados son parte de la invención en el sentido de que son parte de la proteína de fusión usada dentro del procedimiento para la producción de proteínas heterólogas a la que la presente invención también se refiere.

Dentro de la presente invención se prefieren los derivados de la N^{Pro} natural de Pestivirus, en los que el número de residuos de cisteína se ha reducido.

Dentro de la presente invención se prefieren particularmente los derivados de N^{Pro} de CSFV naturales.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en la que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV natural seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituido por un residuo de ácido glutámico.

Por tanto, la presente invención se refiere, en otro aspecto, a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en la que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV natural seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituido por un residuo de ácido glutámico.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en la que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV natural seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituido por un residuo de ácido glutámico.

Preferencia adicional se da a la autoproteasa N^{Pro} de CSFV que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos.

SEC ID N° 2:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTTL
RDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFEEVTKRIGRVTG
SDGKLYH IYVEVDGEI LLLKLA KRGT PRTLKWI RNFTNCPLWVTSC-(168)

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere con preferencia adicional a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 2.

La solubilidad de los derivados se determina del siguiente modo: Tras 72 horas, se centrifuga una solución concentrada del correspondiente derivado N^{Pro}, el sedimento se disuelve y se aplica a la electroforesis en gel de

SDS. Una parte del sobrenadante se combina con tampón de sonda y se aplica a la electroforesis en gel de SDS. Tras la electroforesis, las bandas se tiñen con azul de Coomassie, se cuantifican mediante densitometría con un sistema Alpha-DigiDoc™ y se calcula la cantidad de material precipitado. Para detalles experimentales véase el ejemplo 2.

La fuerza iónica del tampón a menudo es limitante para ciertos procesos de producción. Por tanto, la presente invención se refiere, en un aspecto adicional, a derivados de la N^{Pro} de Pestivirus natural, que tienen un pI más neutro que la N^{Pro} de Pestivirus natural. Se prefiere adapta el pI del resto de N^{Pro} de Pestivirus del polipéptido de fusión para que se exprese lo más cerca posible al pI del segundo polipéptido (el polipéptido de interés). Por ejemplo, el resto de N^{Pro} de Pestivirus del polipéptido de fusión puede tener un pI de 5,5 a 9,5, especialmente de 6,0 a 9,0.

De acuerdo con esto, dentro de la presente invención se da preferencia adicional a un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, al menos un residuo aminoácido básico está sustituido por un residuo de aminoácido ácido.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere con preferencia adicional a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, al menos un residuo aminoácido básico está sustituido por un residuo de aminoácido ácido.

Preferencia adicional se da a un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, además, se intercambia al menos uno de los siguientes aminoácidos: H5, K16, N35, R53, 854, R57, L143, K145 y R150. Un ejemplo preferido es un derivado en el que se intercambian los aminoácidos siguientes: arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), y leucina (L) 143 con glutamina (Q).

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere con preferencia adicional a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, se intercambian los siguientes aminoácidos: arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), y leucina (L) 143 con glutamina (Q).

En otra realización preferida de la presente invención, un derivado de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV, comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 3:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETI
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKGPGVYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFEEVTKRIGR
VTGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGTPRTLKWIRNFTNCPLWWTSC-(168).

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 3.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un derivado de la N^{Pro} de Pestivirus natural, que muestra además de la agregación reducida y pI más neutro una solubilidad más potenciada en comparación con la N^{Pro} de Pestivirus natural.

La solubilidad se determina como se ha descrito en lo que antecede.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que, además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, al menos un residuo aminoácido hidrófobo está sustituido por un residuo hidrófilo.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, al menos un residuo aminoácido hidrófobo está sustituido por un residuo hidrófilo.

Dentro de la presente invención se prefiere un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, además, se intercambia al menos uno de los siguientes aminoácidos: V24, A27, L32, 854, L75, A109, V114, V121, L143, 1155 y F158. Un ejemplo preferido es un derivado en el que se intercambian los aminoácidos siguientes por treonina (T): alanina (A) 109, valina (V) 114, isoleucina (I) 155 y fenilalanina (F) 158.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere preferentemente a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, se intercambian los siguientes aminoácidos por treonina (T): alanina (A) 109, valina (V) 114, isoleucina (I) 155 y fenilalanina (F) 158. Dentro de la presente invención, otro derivado más preferido de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 4:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDETQFEETIKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKLA KRGT PRTLKWTRNTINCPLWVTSC-(168)

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere más preferentemente a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 4.

Incluso más preferido dentro de la presente invención se prefiere un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, los siguientes aminoácidos se han intercambiado: alanina (A) 109, valina (V) 114, isoleucina (I) 155 y fenilalanina (F) 158 por treonina (T), arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), y leucina (L) 143 con glutamina (Q).

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere incluso más preferentemente a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV, en el que además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, se han intercambiado los siguientes aminoácidos: alanina (A) 109, valina (V) 114, isoleucina (I) 155 y fenilalanina (F) 158 por treonina (T), arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), y leucina (L) 143 con glutamina (Q).

Más preferentemente, el derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la presente invención comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 5:

(1)-MELNHFEILYKTSKaKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDETQFEETTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGT PRTLKWTRNTNCPIWVTSC-(168).

Por tanto, en otro aspecto más preferido, la presente invención se refiere también a un procedimiento como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 5.

En otro aspecto igualmente preferido, la presente invención se refiere también a un procedimiento para la producción de proteínas heterólogas como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 5, En el que además la asparagina (N) 35 se sustituye con treonina (T), y la treonina (T) 158 se sustituye con serina (S).

El derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que se usa en el procedimiento de acuerdo con el aspecto anterior de la presente invención forma también parte de la presente invención y comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 32:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGTPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPWHRAPLEFFDETQFEETTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGT PRTLKWTRNSTNCPLWVTSC-(168).

En otro aspecto preferido, la presente invención se refiere también a un procedimiento para la producción de proteínas heterólogas como se ha descrito anteriormente, en el que el polipéptido de fusión comprende un derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que tiene una secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 32, en el que además la alanina (a) 28 está sustituida con ácido glutámico (E), serina (S) 71 está sustituida con fenilalanina (F) y arginina (R) 150 está sustituida con histidina (H).

El derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que se usa en el procedimiento de acuerdo con el aspecto anterior de la presente invención forma también parte de la presente invención y comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

5 SEC ID N° 33:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTEGRPLFGTPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRFGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHRAPLEFFDETQFEETTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGTPHTLKWTRNSTNCPLWWTSC-(168).

10 Preferentemente, en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV con la secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 32 se usa en fusión con una proteína que contiene al menos los tres primeros aminoácidos de la proinsulina, más preferentemente con proinsulina, además más preferentemente con proinsulina humana, más preferentemente con proinsulina humana recombinante, para la producción de proinsulina.

15 Se prefiere, de acuerdo con la presente invención, si el derivado de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV tiene además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, al menos uno de los siguientes aminoácidos: arginina (R) 53, glicina (8) 54, arginina (R) 57, treonina (T) 109, 114, 155, 158 y leucina (L) 143. Derivados preferidos de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la presente invención tienen además de la sustitución de al menos un residuo de cisteína como se ha descrito anteriormente, se intercambian los aminoácidos siguientes: arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), treonina (T) 109, 114, 155, 158 con serina (S) y leucina (L) 143 con glutamina (Q) o asparagina (N) o ácido aspártico (D) o serina (S) o histidina:

20 Dichos derivados preferidos de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV que se usan en el procedimiento de acuerdo con el aspecto anterior de la presente invención forma también parte de la presente invención y comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos:

30 SEC ID 34

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEI LLSAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWWTSC-(168).

35 SEC ID 35:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKNAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWWTSC-(168).

40 SEC ID 36:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNH LGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV TGSDGKLYH
IYVEVDGEI LLKDAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWWTSC-(168).

45 SEC ID 37:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLKHAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWWTSC-(168).

50 SEC ID 38:

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETI
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGPHYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGC
VTGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWWTSC-(168).

55 Los derivados de la N^{Pro} de CSFV natural descritos anteriormente que forman parte de la presente invención tienen mejores propiedades sobre la N^{Pro} de CSFV natural y, por tanto, son adecuados para potenciar la eficiencia de la producción de proteínas. El plegamiento de los derivados descritos en la presente invención se puede inducir in vitro en un amplio abanico de condiciones, por ejemplo en fuerzas iónicas más bajas, en las que la N^{Pro} natural no sería funcional. Por tanto, los derivados descritos en lo que antecede son adecuados para uso en las condiciones de reacción que no permiten el uso con éxito de la N^{Pro} natural. Los derivados que se describen por último en el presente documento son particularmente preferidos dentro de la presente invención, debido a su idoneidad para usar en un abanico particularmente amplio de condiciones de reacción.

65 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los derivados de una autoproteasa N^{Pro} de CSFV como se ha descrito anteriormente, en un procedimiento para la producción de polipéptidos heterólogos de interés de acuerdo con la presente invención.

5 Por tanto, en el procedimiento para la producción recombinante de polipéptidos heterólogos de interés de acuerdo con la presente invención, el polipéptido de fusión comprende uno cualquiera de los derivados descritos anteriormente de una adicional, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los derivados de una autoproteasa.

10 En una realización preferida de la presente invención, la inducción de la escisión autoproteolítica del polipéptido heterólogo se realiza diluyendo el polipéptido de fusión en condiciones que estimulan el repliegamiento. De este modo, el polipéptido de fusión inactivo se repliega y, por tanto, se activa.

15 En una realización particularmente preferida, el solubilizado se diluye con un tampón que contiene arginina de modo que la concentración final de arginina es de hasta ,0 M, preferentemente 0,4 -0,6 M. Como alternativa, la dilución también es posible dializando los cuerpos de inclusión solubilizados contra un tampón de escisión adecuado que contiene arginina.

20 La temperatura de la solución de reacción para la escisión es, por ejemplo, entre 0 °C y 30 °C. La temperatura puede ser de, preferentemente, 10 °C – 20 °C.

El pH de la solución de reacción es, por ejemplo, 5,0 – 9,0. El pH es, preferentemente, 7,0 – 8,0, en particular 7,0 – 7,5. Más preferentemente, el pH es 7,4.

25 Cuando sea adecuado, la solución de reacción contiene DTT en una concentración de 0,5 - 100 mM. La concentración de DTT es, preferentemente, de aproximadamente 5,5 mM.

La concentración de proteínas en la solución de reacción durante la escisión puede estar, por ejemplo, en la zona de 20 - 150 µg/ml. La concentración de proteínas es, preferentemente, inferior a 40 µg/ml.

30 La solución de reacción puede contener tris/HCl en una concentración de, por ejemplo, hasta 1,5 M durante la escisión. La concentración de tris/HCl es, preferentemente, entre 0,4 M y 1,2 M.

La solución de reacción puede contener glicerol en un intervalo de concentración de, por ejemplo, entre 0,2 y 1 %. Más preferentemente, la concentración de glicerol es 5 %.

35 Asimismo, la solución de reacción puede contener EDTA en un intervalo de aproximadamente 1 - 3 mM de EDTA. Preferentemente, la concentración de EDTA es 2 mM.

También son posibles otros sistemas tampón en lugar de tampones que contienen arginina y/o que contienen tris/HCl.

40 En una realización particularmente preferida, el pH en el tampón de escisión es 7,4, la temperatura durante la escisión es de 10 °C - 20 °C y el tampón de escisión contiene DTT aproximadamente 10 mM como agente reductor, NaCl 0,5M, 5 % de glicerol y EDTA 2 mM.

45 Por último, el polipéptido heterólogo que se ha escindido del polipéptido de fusión se aísla de un modo conocido per se.

50 En otra realización preferida de la presente invención, la inducción de la escisión autoproteolítica del polipéptido heterólogo se realiza uniendo el polipéptido de fusión a un sistema cromatográfico de afinidad con su parte autoproteolítica en una forma inactiva y la posterior aplicación de un tampón de repliegamiento. En particular, en una primera etapa, el polipéptido de fusión se une al sistema cromatográfico. La unión se mantiene cuando las condiciones se cambian de un modo tal que la parte autoproteolítica del polipéptido de fusión conserva su actividad. El polipéptido de interés se escinde y eluye mientras la parte autoproteolítica del polipéptido de fusión permanece unido al sistema cromatográfico.

55 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sistema cromatográfico de afinidad es una columna y el polipéptido de fusión se inactiva mediante desnaturalización. Por tanto, la reactivación de la actividad autoproteolítica se induce mediante la aplicación de tampón de repliegamiento y, por tanto, repliegando el polipéptido de fusión.

60 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el repliegamiento se realiza en un tampón con la composición siguiente: NaCl 0,5M, fosfato sódico 20 mM, 5 % de glicerol, EDTA 2 mM, DTT 10 mM 0,01 % de Brij, pH 7,4.

65 Como se usa en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados que se describen a continuación:

La expresión "polipéptido heterólogo de interés" significa un polipéptido que no es escindido de forma natural por una autoproteasa NPro de Pestivirus de un polipéptido o poliproteína de fusión que se producen de forma natural. Ejemplos de polipéptidos heterólogos son enzimas industriales (enzimas de procesos) o polipéptidos con actividad farmacéutica, en particular farmacéutica humana.

5 La expresión "polipéptido de fusión" se refiere a polipéptidos que consisten en dos o más polipéptidos. En particular, en el presente documento, los polipéptidos de fusión pueden comprender un marcador de afinidad, una parte autoproteolítica, preferentemente una autoproteasa, y el polipéptido de interés.

10 La expresión "polipéptido de interés" se refiere al polipéptido que se va a producir con un extremo N homogéneo.

De acuerdo con la presente invención, se puede usar un vector de expresión que codifique el polipéptido de interés como parte del polipéptido de fusión que se va a escindir autoproteolíticamente. De acuerdo con la presente invención se pueden producir diversos polipéptidos de interés mediante el uso de dicho vector de expresión. Por ejemplo, el polipéptido de interés es uno que ejerce actividad farmacológica y puede seleccionarse de, por ejemplo, el grupo que consiste en un interferón, una interleuquina, una hormona de crecimiento, un factor de crecimiento, una citoquina, una enzima, un inhibidor enzimático, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo y similares, por ejemplo interferón alfa 2A, interferón alfa 2B, interleuquina 3, interleuquina 6, hormona de crecimiento humana, (pro)insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, factor estimulante de las colonias de granulocitos, factor estimulante de las colonias de macrófagos – granulocitos, factor estimulante de las colonias de macrófagos, interferón beta 1, somatropina bovina, somatropina porcina, interleuquina 11, interleuquina 2, un fragmento Fac un péptidos pequeños tales como calcitonina, hormona paratifoidea (PTH) o glucagón, una forma soluble ligando de CD40, activador del plasminógeno, proteína de unión a esteroides sexuales, factor de crecimiento epidérmico, dominio extracelular del factor tisular.

25 Además del polipéptido de interés puede ser cualquier otro tipo de polipéptido, en particular un polipéptido que es especialmente adecuado para procedimientos analíticos, por ejemplo la proteína fluorescente verde.

30 En el vector de expresión que se va a emplear en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el polipéptido de fusión está unido operablemente a al menos una secuencia de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión son, en concreto, promotores (tales como los promotores, tac, 13, T1, trp, gac, vhb, lambda pL o phoA), sitios de unión al ribosoma (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma naturales que pertenecen a los promotores mencionados anteriormente, sitios de unión al ribosoma cro o sintéticos) o terminadores de la transcripción (por ejemplo, rrnB T1T2 o bla).

35 El vector puede también contener secuencias que codifican dominios de fusión, como se describe más adelante, que están presentes en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión y que se requieren para su unión al sistema de cromatografía de afinidad, por ejemplo ácidos poliamino como polilisino o, para cromatografía de inmutafinidad, los denominados "marcadores del epítipo", que normalmente son secuencias peptídicas para las que está disponible un anticuerpo específico. Marcadores de epítipos bien conocidos para los que se dispone fácilmente de anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAF, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y marcadores c-myc.

En una realización preferida de la presente invención, el vector de expresión es un plásmido.

45 Una célula huésped bacteriana que se va a usar en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de, por ejemplo, el grupo de los siguientes microorganismos. Bacterias gramnegativas tales como especies de Escherichia, por ejemplo E. coli, u otras bacterias gramnegativas, por ejemplo Pseudomonas sp., tales como Pseudomonas aeruginosa, o Caulobacter sp., tales como Caulobacter crescendos, o bacterias grampositivas tales como Bacillus sp., en particular Bacillus subtilis. E. coli es particularmente preferida como célula huésped.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "células huésped transformadas" hacen referencia a una célula que contiene un vector que codifica un polipéptidos heterólogo.

55 La célula huésped bacteriana, es decir la cepa de expresión, se cultiva de acuerdo con la práctica microbiológica conocida per se. La cepa generalmente se lleva a partir de una única colonia en un medio nutriente, pero también es posible emplear suspensiones celulares criopreservadas (bancos celulares). Generalmente, la cepa se cultiva en un procedimiento de múltiples etapas con el fin de obtener suficiente biomasa para usar después.

60 A una escala pequeña, esto puede tener lugar en matraces agitados, siendo posible, en la mayoría de los casos, emplear un medio complejo (por ejemplo, caldo LB). No obstante, también es posible usar medio definido (por ejemplo, medio citrato). Para el cultivo, se cultiva un precultivo de volumen pequeño de la cepa huésped (inoculado con una única colonia o con una suspensión celular de un criocultivo), la temperatura para este cultivo no suele ser crucial para el último resultado de la expresión, por lo que es posible operar de forma rutinaria a temperaturas relativamente altas (p. ej., a 30 °C o 37 °C). El cultivo principal se establece en un volumen más grande (por ejemplo, 500 ml), en el que es, en concreto, necesario para garantizar una buena aireación (gran volumen de matraz en comparación con el volumen de los contenidos, alta velocidad de rotación). Dado que se pretende que la expresión

tenga lugar en forma de cuerpos de inclusión insolubles, el cultivo principal también se llevará a cabo, en la mayoría de los casos, a una temperatura relativamente alta (por ejemplo a 30 °C o 37 °C). Los sistemas inducibles son particularmente adecuados para producir cuerpos de inclusión (por ejemplo, con el promotor trp, lac, tac o phoA). Después de alcanzar la última fase logarítmica (normalmente a una densidad óptica de 0,5 a 1,0 en matraces agitados), en estos casos se añade la sustancia inductora (p. ej., ácido indolacrilico, isopropil β-D-tiogalactopiranosido = IPTG) y la incubación continua de 1 a 5 horas. Durante este tiempo, la mayoría del polipéptido de fusión N^{Pro} se deposita como cuerpos de inclusión en el citoplasma bacteriano. Las células resultantes se pueden recoger y procesar después.

5
10
15
20
A mayor escala, el sistema de múltiples etapas consiste en una pluralidad de biorreactores (fermentadores), prefiriéndose emplear medios nutrientes definidos en este caso con el fin de mejorar el control de ingeniería de procedimientos del procedimiento. Además, es posible aumentar considerablemente la biomasa y la formación del producto midiendo en nutrientes concretos (lote de alimentación). Por el contrario, el procedimiento es análogo al matraz agitado. Por ejemplo, se usan un fermentador de etapa preliminar y un fermentador de etapa principal, escogiéndose la temperatura de cultivo similar a la del matraz agitado. En el fermentador de etapa preliminar se inocula el denominado inóculo, que generalmente se cultiva a partir de una única colonia o un criocultivo en un matraz agitado. También se debe asegurar una buena aireación y una concentración suficiente del inductor en el fermentador, y especialmente en la principal etapa del mismo. No obstante, la fase de inducción debe hacerse distinta en algunos casos más larga en comparación con el matraz agitado. Las células resultantes se liberan, de nuevo, para su posterior procesamiento.

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, los cuerpos de inclusión se aíslan de la célula huésped de un modo conocido per se.

25
30
35
40
Por ejemplo, una vez que ha tenido lugar la fermentación, las células huésped se recogen mediante centrifugación, microfiltración, floculación o una combinación de los mismos, preferentemente mediante centrifugación. La masa celular húmeda se disgrega por medios mecánicos, químicos o físicos, tales como homogeneizador a presión alta, trituración con perlas, prensa francesa, prensa Hughes, choque osmótico, detergentes, lisis enzimática o una combinación de los mismos. Preferentemente, la rotura de las células tiene lugar mediante homogeneización a presión alta. En el caso favorecido de que el polipéptido de fusión recombinante se deposita como cuerpos de inclusión, los cuerpos de inclusión se pueden obtener por medio de, por ejemplo, dispersión de alta presión o, preferentemente, mediante una simple centrifugación a una velocidad de rotor baja. Los cuerpos de inclusión se separan mediante centrifugación o microfiltración o una combinación de ambos. La pureza en relación con el polipéptido de interés deseado puede mejorarse mediante resuspensión múltiple de los cuerpos de inclusión en varios tampones, por ejemplo en presencia de NaCl (por ejemplo, 0,5-1.0 M) y/o detergente (por ejemplo, Triton X-100). Preferentemente, la pureza de la preparación de cuerpos de inclusión se mejora mediante varias etapas de lavado con varios tampones (p. ej., desoxicolato al 0,5 % seguido de dos veces la solución de NaCl 1M y, por último, agua destilada). Esto normalmente tiene como resultado la eliminación de la mayoría de los polipéptidos extraños en los cuerpos de inclusión.

45
50
Como se usa en el presente documento, el término "solubilización" hará referencia al procedimiento necesario para disolver los cuerpos de inclusión. La solubilización tiene como resultado una dispersión monomolecular de los polipéptidos con mínimas interacciones intra e intermoleculares.

Un modo de solubilización preferido de los cuerpos de inclusión dentro del alcance de la presente invención se realiza mediante una suspensión en Tris/HCl 50 mM, urea 8M, pH 7,3, añadiendo un agente reductor, por ejemplo DTT 50 mM, guanidinio-HCl o guanidinio SCN 4-8M para prevenir la oxidación de los residuos de cisteína presentes en última instancia. Cuando sea necesario, es posible eliminar el material potencialmente insoluble, por ejemplo mediante centrifugación.

55
60
En el caso en el que el polipéptido de fusión inactivo se haga soluble en la célula, el homogeneizado celular aclarado se somete a procesamiento adicional descrito anteriormente para los cuerpos de inclusión solubilizados, a excepción de la etapa de dilución, ya que el homogeneizado celular ya se ha diluido.

En una realización particularmente preferida, el solubilizado se diluye con un tampón que contiene Tris/HCl de modo que la concentración final de Tris/HCl es de hasta 1,5 M, preferentemente 0,4 – 1,2 M. Como alternativa, la dilución también es posible dializando los cuerpos de inclusión solubilizados contra un tampón de escisión adecuado que contiene Tris/HCl adecuado. El Tris/HCl se puede sustituir por otras sales, por ejemplo NaCl 0,2 – 1,5 M su se añade una sustancia tampón adecuada, por ejemplo fosfato sódico 20 mM.

65
La temperatura de la solución de reacción para la escisión es, por ejemplo, entre 0 °C y 30 °C. La temperatura puede ser de, preferentemente, 10 °C – 20 °C.

El pH de la solución de reacción es, por ejemplo, 5,0 – 9,0. El pH es, preferentemente, 7,0 – 8,0, en particular 7,0 – 7,5. Más preferentemente, el pH es 7,4.

Quando sea adecuado, la solución de reacción contiene DTT en una concentración de 0,5 - 100 mM. La concentración de DTT es, preferentemente, de aproximadamente 10 mM.

5 La concentración de proteínas en la solución de reacción durante la escisión puede estar, por ejemplo, en la zona de 20 - 150 µg/ml. La concentración de proteínas es, preferentemente, inferior a 40 µg/ml.

La solución de reacción puede contener arginina en una concentración de, por ejemplo, hasta 1,0 M durante la escisión. La concentración de tris/HCl es, preferentemente, entre 0,4 M y 0,6 M.

10 La solución de reacción puede contener glicerol en un intervalo de concentración de, por ejemplo, entre 0,2 y 30 %. Más preferentemente, la concentración de glicerol es 5 %.

15 Asimismo, la solución de reacción puede contener EDTA en un intervalo de aproximadamente 1 - 3 mM de EDTA. Preferentemente, la concentración de EDTA es 2 mM. También son posibles otros sistemas tampón en lugar de tampones que contienen arginina y/o que contienen tris/HCl.

20 En una realización particularmente preferida, el pH en el tampón de escisión es 7,4, la temperatura durante la escisión es de 10 °C - 20 °C y el tampón de escisión contiene DTT aproximadamente 10 mM como agente reductor, NaCl 0,5 M, fosfato sódico 20 mM, 5 % de glicerol y EDTA 2 mM.

Por último, el polipéptido heterólogo que se ha escindido del proteína de fusión se aísla de un modo conocido per se.

25 La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes, que solo son ilustrativos y no limitantes. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplos

30 Con la presente invención es posible expresar y producir una amplia variedad de proteínas recombinantes (o "polipéptidos de interés"), especialmente proteínas tales que son problemáticas de expresar en los sistemas habituales, por ejemplo proteínas con efectos tóxicos sobre las células huésped, proteínas que son insolubles o que tienen baja solubilidad, proteínas que tienen otras desventajas de solubilidad (p. ej., proteínas más cortas). Los presentes derivados también muestran, en forma de constructos de fusión específicos o condiciones de activación específicos, mejoras en las velocidades de escisión, velocidades de expresión, velocidades de producción global. Además, la expresión en los cuerpos de inclusión con los presentes constructos muestran resultados ventajosos para los problemas mencionados anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo 11).

40 Por ejemplo, las proteínas pequeñas tienen, generalmente, velocidades de expresión bajas en E. coli, porque se degradan rápidamente en células bacterianas, los constructos de acuerdo con la presente invención permiten niveles de expresión elevados (véase el ejemplo 14).

45 Los ejemplos 1, 3, 4, 5, 8 y 9 describen la producción de proinsulina usando diferentes aspectos del procedimiento de acuerdo con la presente invención. La secuencia de la proinsulina se facilita más adelante en la SEC ID N° 6, formando la parte no negrita de la secuencia. A continuación, por comodidad, la proinsulina en ocasiones se denomina insulina.

Ejemplo 1

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (insulina) mediante replegamiento usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 5 (EDDIE)

1.1 Generación de derivados

1.1.1 PCR mutacional

55 A partir del constructor que contiene la secuencia de ADN para N^{Pro}-pro-insulina (SEC ID N° 6):

ATGGAACTCAATCATTTGGAAGCTGCTCTACAAAAGCTGCAAGCAAAAACCTGTTGGCGT
 TGAAGAGCCGGTCTACGATACTGCAGGTCGTCTCTTTTTGGGAATCCGTCCGAAGTG
 CACCCCCAGTCAACCCTCAAGCTTCCCATGACCCGCGGACGCGGTGACATTTCGTACAA
 60 CGCTGCGGATCTGCCTCGTAAAGGCGATTGTCGCTCTGGAACCACCTAGGTCCGGT
 GTCGGGCATTTACATTAACCAGGTCCCGTCTATTACCAAGACTACACTGGTCCGGTTT
 ACCATCGTGCACCTCTGGAATTCTTTGATGAAGCTCAATTTGCGAAGTGACTAAACGT
 ATTGGCCGTGTAACCCGTTCCGGACGGGAAACTGTACCACATCTACGTGTGCGTTGATG
 GCTGTATCCTGCTGAAACTCGGAAGCGGAAACCCCTCGCACCCCTGAAATGGATCCG
 65 TAACCTCACTAAGTCCACTGTGGGTCAGTTGCTTCGTTAACCAACATCTGTGCG
 GTTCACACCTTGGAAGCCCTGTATCTGGTGTGTGGCGAACGCGGATTCTTTTATACC

CCGAAAACGCGGCGCGAAGCCGAAGATCTTCAGGTTGGTCAAGTGAACTGGGCGGA
GGTCCGGGAGCCGGGAGCCTGCAACCGCTGGCGCTTGAAGGGTCTGCTGCAAAAACGG
GGTATTGTTGAACAGTGCTGTACCTCCATCTGCTCTGTATCAGCTGGAAAACACTG
CAATTAATAA

que se sintetiza de forma adaptada y se inserta en (NCBI #U07650: National Centre for Biotechnology Information Plasmid Database, National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, EE.UU.) de Operon Biotechnologies Inc. (1000 Atlantic Avenue, Suite 108 Alameda, CA 94501, EE.UU.). A partir de este constructor, la secuencia de N^{Pro} requerida indicada en negrita, se amplifica mediante PCR usando el siguiente par de cebadores:

N^{Pro} -F-Ndel, (SEC ID N° 20) y N^{Pro} -R-Sall, (SEC ID N° 21) y se inserta mediante los sitios de restricción recién creados para Ndel y Sall (letras en negrita, tabla 1 más adelante) en el vector pET30a (# 69909-3, 2002-2003 catálogo, Novagen, CN Biosciences Inc., Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) creando S-Np-6H-pET30a. De S-Np-6H-pET30a, la secuencia de N^{Pro} se amplifica mediante dos reacciones de PCR estándar con 50 µl: Una con 50 pmol del cebador N^{Pro} -F-Ndel (SEC ID N° 20) y 50 pmol de un cebador de mutación inversa seleccionado de la Tabla 1 (SEC ID N° 8,10,12,14,16,18), 5 unidades de ADN polimerasa Taq (# GC 002004, catálogo 2004 Genecraft, Treskow Strar.e 10,0-48163 Munster, Alemania), 1x tampón de PCR (# GC 002006 catálogo 2004, Genecraft y 20 nmol de mezcla de cada dNTP (# GC 013004, catálogo 2004, Genecraft); la segunda con 50 pmol del cebador N^{Pro} -R-Sall (SEC ID N° 21) y 50 pmol de un cebador de mutación directo, seleccionado de la Tabla1, (SEC ID N° 7, 9, 11, 13, 15, 17) 5 unidades de ADN polimerasa Taq, 1 x tampón para PCR y 20 nmol de cada mezcla de dNTP. La reacción de PCR tiene lugar en un termociclador de tapa en caliente usando el programa siguiente:
94° C durante 3 minutos; 25 ciclos: 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 1 minuto; incubación final a 68 °C durante 7 minutos.

1.1.2 Amplificación del mutante mediante PCR

Los cebadores de la mutación proporcionados en la Tabla 1 se usan para introducir los respectivos cambios de aminoácidos. Un /100 de las PCR se combina y amplifica en una reacción para PCR estándar de 50 µl con 50 pmol de N^{Pro} -F-Ndel cebador (SEC ID N° 20) y 50 pmol de N^{Pro} -R-Sall cebador (SEC ID N° 21), como se ha descrito anteriormente. Los cebadores libres se eliminan mediante el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse 1, 040724 Hilden, Cat. Nr.28104, Guía de productos de Quiagen 2005) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos de PCR se insertan mediante los sitios de restricción Ndel y Sall en el vector pET30a. Después, el constructor se usa para la siguiente etapa de mutación. Esto se realiza en una serie de etapas consecutivas para introducir los cambios de aminoácidos necesarios para crear el derivado de N^{Pro} deseado. En el caso de este ejemplo, el procedimiento se repite seis veces. Los intercambios de aminoácidos respectivos se indican en la tabla 1. El plásmido sobresaliente de cada etapa está controlado mediante análisis de la secuencia del ADN como se ha descrito (véase 4.1). Las mutaciones 1155T y F158T se introducen mediante una única reacción de PCR con el par de cebadores N^{Pro} -F-Ndel (SEC ID N° 20) y 3'-155T, F158T (SEC ID N° 19) y el producto resultante de la PCR se inserta mediante los sitios de restricción Ndel y SpeI en S-Np-6H-pET30a. La combinación de los once cambios de aminoácidos tiene como resultado EDDIE-6H-pET30a, en el que EDDIE representa el mutante de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV con las SEC ID N° 5.

Tabla 1: Cebadores para mutación con los correspondientes cambios de aminoácidos:

5'_C112E	SEC ID N° 7: GCT CAA TTT GAG GTGG ACT AAA CG
3'_C112E	SEC ID N° 8: CGT TTA GTC ACT TCC TCA MTTGA GC
5'_C134E	SEC ID N° 9: CAT CTA CGT GGA GGT TGA TGG C
3'_C134E	SEC ID N° 10: GCC ATC MCCTC CAC GTA GAT G
5'_C138E	SEC ID N° 11: GTT GAT GGC GAG ATC CTG CTG
3'_C138E	SEC ID N° 12: CAG CAG GAT CTC GCC ATC MC
5'_A109T, V114T	SEC ID N° 13: CTG GAA TIC TTT GAT GAA ACC CAA TTT GAG GAA ACC ACT AAA CGT ATT GG
3' A109T, V114T	SEC ID N° 14: CCA ATA CGT ITA GTG GTT TCC TCA AAT TGG GTT TCA TCA AAG AAT TCC AG
5'_R53E, G540, R 57E	SEC ID N° 15: CAT GAC CGC GGA GAA GAT GAC ATT GAA ACAACGCTGC
3'_R53E, G540, R 57E	SEC ID N° 16: GCA GCG TTG TTT CAA TGT CAT CTT CTC CGC GGTCATG
5'_L143Q	SEC ID N° 17: GAT CCT GCT GMACA GGC GMGCG CGG MC
3'_L 143Q	SEC ID N° 18: GTT CCG CGC TTC GCC TGT TTC AGC AGG ATC
3_1155T, F158T	SEC ID N° 19: GCA ACT AGT GAC CCA CAG TGG ACA GTT AGTGGT GTT ACG GGT CCA TTT CAG G
N ^{Pro} -F-Ndel	SEC ID N° 20 : CGC GAC ATA TGG MCTCA ATC ATT TCG MC-3
N ^{Pro} -R-Sall	SEC ID N° 21 : CGC AGA GAT GTT GGT CGA CGC TGC AAC TAG TG

1.2 Construcción del plásmido

Este procedimiento se realiza de forma análoga al descrito en 4.1.

1.3 Transformación de las células huésped

Estos procedimientos se realizan de forma análoga al descrito en 4.2 más adelante.

1.4 Expresión y fermentación

Estos procedimientos se realizan de forma análoga al descrito en 4.3 más adelante.

1.5 Escisión

1 ml del cultivo durante la noche de las células huésped transformadas como se ha descrito en 4.2 con el constructo 6H-EDDIE-SDDInspET30a (para la construcción véase 4.1) se transfiere en 100 ml de medio M9-KAN (Na_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 20 mM, NaCl 10 mM, NH_4Cl 20 mM, MgSO_4 1 mM, 0,4 % en peso/v de Glucosa, 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamina), incubado a 37° C y a 225 rpm hasta una DO de 0,5 e inducida la expresión con IPTG 1 mM a 37° C durante 2 horas. Las células se centrifugan a 2500 g durante 15 min. El sedimento se suspende en 8 ml de tampón de lisis (Na_2HPO_4 20mM, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM, MgCl_2 2 mM), se transfiere a una cámara de prensa previamente enfriada y se incuba a 1380 bares durante 5 minutos. La válvula se abre lentamente y alícuotas de 500 μl se vierten gota a gota (2 - 4 gotas/10 segundos) en tubos de 1,5 ml. El homogeneizado se centrifuga durante 15 minutos a 19.000 g y a 4 °C, el sobrenadante se desecha y el sedimento se suspende en 30 μl de tampón de lisis (o H_2O). Se añaden 500 μl de solución de guanidinio.HCl (Guanidinio HCl 5M, Tris 120 mM, pH 7,3, DTT 25 Mm) y se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se transfieren 10 μl a un tubo de reacción limpio para precipitación en TCA (control IB), se transfieren otros 10 μl en un tubo limpio para renaturalización in vitro mediante dilución a 1:50 con 490 μl de tampón de replegamiento (NaCl 0,5 M, 5 % de glicerol, EDTA 2 Mm, DTT 10 Mm, pH 7,4) durante 40 minutos a TA seguido de precipitación en TCA. Los precipitados en TCA se centrifugan, se desecha el SN, se disuelve el sedimento en 10 μl x SDS-PAGE tampón de sonda y el éxito de la renaturalización y la escisión se analiza mediante SDS-PAGE. El gel se tiñe con azul brillante de Coomassie R250 (Fluka cat. n. 27816, Laborchemikalien und analytische Reagentien 2005/2006, Fluka Chemie GmbH, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, Suiza), las bandas de los polipéptidos de fusión sin escindir y la autoproteasa escindida se cuantifican mediante densitometría en base a la medición de la absorción de la luz blanca por la tinción y se calcula la cantidad de escisión.

Ejemplo 2

Determinación de la solubilidad

El sedimento de un cultivo de 800 ml de *E. coli* BL21 (DE3) transformado con EDDIE-6H-pET30a (para la construcción véase 1.1.2) se prepara como se ha descrito en 4.3. El sedimento se suspende en 40 ml/g de tampón de lisis (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM, MgCl_2 2 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM pH 8). La lisis de las células se alcanza mediante dos pases a través de una celda de presión (1380 bares). Tras incubar durante 15 minutos con 1 % de Triton X-100 (solubilizado en 5 ml/g de tampón de lisis), el homogeneizado celular se centrifuga con 25.000 g durante 45 minutos, el sobrenadante se desecha y los cuerpos de inclusión (IB) se almacenan a -20 °C. Los cuerpos de inclusión se disuelven hasta 1,3 ml/g de IB en solución de cloruro de guanidinio (GuCl 5 M, Tris 120 mM, DTT 25 mM, pH 7,5) se incuban durante 3,5 horas a temperatura ambiente y se centrifugan con 25.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se diluye hasta 30 ml/g de IB en tampón de replegamiento (Tris 0,4 M, DTT 10 mM, EDTA 2 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,3), se incuba durante la noche a temperatura ambiente, se centrifuga y se filtra en esterilización. El derivado de N^{Pro} se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de sefrosa SP con un volumen de 50 ml. La columna se equilibra con 3 CB de Tris 0,4 mM pH 7,3 y tras la aplicación de la solución de replegamiento lavada con NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 20 mM, pH 7,5. La elución se lleva a cabo con 3 CV NaCl 600 mM, Na_2HPO_4 20 mM, 5 % de Glicerol, pH 7,5. Las Fracciones 8 y 9 (8,5 ml cada una) que contienen la proteína se combinan y se concentran mediante filtración en membrana (Amicon Centricon plus-20, #U FC2LGC24, catálogo de productos 2004, Millipore Corporation, 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821, EE.UU.) usando centrifugación (30 min 805 g) y la solución resultante se somete a una segunda etapa de concentración (Amicon Microcon YM-1 0, #42407, catálogo de productos 2004, Millipore Corporation) durante 30 minutos a 17.000 g y a temperatura ambiente. Tras 72 horas, la solución concentrada se centrifuga (10 minutos, 17.000 g, temperatura ambiente), el sedimento se disuelve en 10 μl 1x SDS-PAGE de tampón de sonda y se aplica a electroforesis en gel de SDS. 10 μl del sobrenadante se combinan con 10 μl 2x SDS-PAGE de tampón de sonda y se aplica a la electroforesis en gel de SDS. Tras la electroforesis, las bandas se tiñen con azul brillante de Coomassie R250, se cuantifican como se ha descrito (2) y se calcula la cantidad de material precipitado.

Ejemplo 3**Producción de un polipéptido heterólogo de interés (insulina) mediante replegamiento usando uno de los derivados de N^{Pro} con las SEC ID N° 2, 3 o 4, respectivamente**

5 Las diferentes etapas del procedimiento se realizan de forma análoga para cada uno de los tres derivados con la SEC ID N° 2, 3 o 4. El resultado de estos derivados es de acuerdo con los resultados alcanzados con el derivado con la SEC ID N° 5 (véase el ejemplo 1).

3.1 Generación de derivados

10

3.1.1 PCR mutacional

Este procedimiento se realiza de forma análoga al descrito en 1.1.1.

3.1.2 Amplificación del mutante mediante PCR

15

Este procedimiento se realiza de forma análoga al descrito en 1.1.2.

3.2 Construcción del plásmido

20

Este procedimiento se realiza de forma análoga al descrito en 4.1.

3.3 Transformación de las células huésped

25

Estos procedimientos se realizan de forma análoga al descrito en 4.2 más adelante.

3.4 Expresión y fermentación

Estos procedimientos se realizan de forma análoga al descrito en 4.3 más adelante.

3.5 Escisión

30

Este procedimiento se realiza de forma análoga al descrito en 1.5.

La solubilidad y la eficiencia de la escisión se pueden analizar usando las técnicas divulgadas en 1.5 y el ejemplo 2.

35

Ejemplo 4**Producción de un polipéptido heterólogo de interés (insulina) mediante replegamiento en columna, usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 5 (EDDIE)**

40

A continuación "EDDIE" indicó el mutante de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV natural con la secuencia de acuerdo con la SEC ID N° 5.

45

Para este experimento, el constructor pET30-6H-EDDIE-SDD-Ins se usa para expresar el polipéptido de fusión 6-HEDDIE-SOD-Ins. Este polipéptido de fusión comprende una forma mutante marcada con 6x histidina en N-terminal de la autoproteasa N^{Pro}, SEC ID N° 5, seguido por un ligador SDD (serina, ácido aspártico, ácido aspártico) y la secuencia de la proinsulina.

4.1 Construcción de plásmidos

50

La secuencia de ADN para N^{Pro}-pro-insulina (SEC ID N° 6) se sintetiza de forma adaptada y se inserta en pUC119 (NCBI #U07650: National Centre for Biotechnology Information Plasmid Database, National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, EE.UU.) de Operon Biotechnologies Inc. (1000 Atlantic Avenue, Suite 108 Alameda, CA 94501, EE.UU.).

55

A partir de este constructor, la secuencia de N^{Pro} requerida (indicada en negrita) se amplifica mediante PCR usando el siguiente par de cebadores: N^{Pro}-F-NdeI (SEC ID N° 20) y Ins-R-SalI (SEC ID N° 22), (5'-CTT TCG TCG ACT TAT TAA TTG CAG TAG TTT TC-3') y el fragmento resultante se inserta mediante los sitios de restricción para NdeI y SalI (letras en negrita) en el vector pET30a. La transformación (véase 4.2) en la cepa de *E. coli* DH5alpha (# 10643-013, Invitrogen catalogue 2003, Invitrogen Life Technologies Corporation, 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482 Carlsbad, California 92008), el aislamiento del ADN del plásmido de clones seleccionados y el análisis de la secuencia de ADN S-Np-Ins-pET30a. A partir de EDDIE-6H-pET30a (véase la construcción en 1.1.2) EDDIE (SEC ID N° 5) se amplifica mediante PCR usando el siguiente par de cebadores: 6H-N^{Pro}-F-NdeI (SEC ID N° 23), (5'-CTC TCA TAT GCA TCA CCA TCA TCA TCA CGA ACT CM TCA TTT CGA ACT GCT C-3' y N^{Pro}-R-SalI (SEC ID N° 21) y el fragmento resultante usado para reemplazar N^{Pro} a través de los sitios de restricción para NdeI y SpeI (letras en

60

negrita) en el constructo S-Np-Ins-pET30a creando 6H-EDDIE-Ins-pET30a. Para crear un sitio de escisión adecuado para la autoproteasa N^{Pro} se amplifica la secuencia de la proinsulina del plásmido 6H-EDDIE- DC Ins-pET30a mediante PCR usando el siguiente par de cebadores: SDDIns-F-Spe (SEC ID N° 24) (5'-GTA ACT AGT TGC AGC GAT GAC HC GH MC CM CAT CTG TGC-3') y Ins R Sall, (SEC ID N° 22) y el fragmento resultante usado para reemplazar la secuencia de la proinsulina mediante los sitios de restricción SpeI y Sall (letras en negrita) en el constructo 6H-EDDIE-Ins-pET30a para crear 6H-EDDIE-SDDIns-pET30a. Las secuencias de los constructos se verifican mediante secuenciación de ADN de acuerdo con técnicas estándar.

4.2 Transformación

Se preparan células electrocompetentes a partir de un litro de cultivo bacteriano (cultivado a 37 °C y a 225 rpm hasta DO₆₀₀= 0,5) La suspensión celular se enfría en hielo durante 15 minutos (agitación continua), se sedimenta (4 °C, 2.500 g, 10 min) y se retira el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspende en un litro de agua desionizada a 4 °C, se centrifuga (4 °C, 2.500 g, 10 min) de nuevo y se lava 2 veces en 50 ml de agua desionizada (4 °C) con etapas de centrifugado intermitentes (4 °C, 2.500 g, 10 min). El precipitado se lava por último en 50 ml de solución de glicerol al 10 % esterilizada (4 °C), se sedimenta (4 °C, 2.500 g, 10 min) y se resuspende en 2,5 ml de solución de glicerol al 10 % (4 °C), se congela y se almacena en alícuotas de 40 µl a -80 °C. Un alícuota de células electrocompetentes se descongela en hielo, se añade 1 µl de reacción de ligamiento que contiene 5 ng de ADN y se transfiere sin burbujas a una cubeta de electroporación con un espacio de electrodos de 1 mm. La electroporación tiene lugar con un BIO-RAD Gene Pulser™ (Bio-Rad Laboratories Inc., 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA; cat. n. 1652077, Life Science Research Products 1998) incluido un controlador de pulso BO-RAD (Bio-Rad Laboratories Inc., 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA; cat. n. 1652098, Life Science Research Products 1998) fijado a ,5 kV, 25 µF, 200 Ohms con un tiempo constante más largo de 4,4 ms, de modo que un plásmido construido como se ha descrito en 4.1 se transfiere a la célula. Inmediatamente después se añaden 180 µl de caldo TY (1,0 % en peso/v de Peptona, 0,7 % en peso/v de extracto de levadura, 0,25 % en peso/v de Na/Cl) y la suspensión se transfiere a un tubo de plástico estéril de 14 ml y se incuba durante 30 minutos (37 °C, 225 rpm). Después, la suspensión se siembra en placas en medio de selección. Tras la incubación durante la noche a 37 °C se escogen colonias, se transfieren a 2 ml de caldo TY y se incuban durante la noche a 37 °C y 225 rpm. Se usa 1 ml del cultivo durante la noche para preparación de plásmido mediante procedimientos estándar y la preparación de plásmido se somete a análisis de restricción y secuenciación de ADN. Tras la verificación mediante análisis de secuencia se usa el plásmido para transformación adicional en cepas de expresión mediante el procedimiento descrito en el mismo.

4.3 Expresión y fermentación

10 ml de un cultivo de expresión durante la noche de células transformadas como se ha descrito anteriormente en 4.2 se diluyen mediante 10 con medio TY (véase 1.1.2) y se incuba durante 30 minutos a 37 °C, 225 rpm, seguido de inducción de expresión de proteínas con ITPG 1 mM (isopropilo-tiogalactósido) durante 2 horas a 37 °C, 225 rpm. Las células se recogen mediante centrifugación a 2.500 g durante 10 minutos y el sedimento se resuspende en 8 ml de tampón de lisis (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 8,0). La suspensión se transfiere después a una celda de presión previamente enfriada y se incuba a 1.380 bares durante 5 minutos. Después, se abre la válvula lentamente y la suspensión de células rotas se vierte gota a gota (2-4 gotas/10 segundos) en un tubo de recolección limpio. Después de un segundo paso a través de la celda de presión, la suspensión se divide en alícuotas de 500 µl y los cuerpos de inclusión se aíslan mediante centrifugación a 4 °C, 20.000 g durante 30 minutos y se almacena a -20 °C (el sobrenadante se retira antes de congelar).

4.4. Escisión en columna de insulina

Uno de estas alícuotas se resuspende en 30 µl de H₂O y después se disuelve añadiendo 500 µl de guanidinio clorhidrato 5M. Tras incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, los cuerpos de inclusión que se disuelven se aplican después sobre una columna de 500 µl cargada con una matriz de afinidad por metal inmovilizado (Quiagen GmbH, Quiagen Strasse 1, 0 40724 Hilden, Cat. Nr 30210). Tras la aplicación, la columna se lava con 5 volúmenes de columna (CV) de guanidinio clorhidrato 5M y la renaturalización de la N^{Pro} mutada se induce mediante intercambio rápido de tampón al tampón de replegamiento (fosfato sódico 20, pH 7,3, NaCl 500 mM, 5 % de glicerina, EDTA 2 mM). El tampón de replegamiento se aplica hasta que no se detecta guanidinio clorhidrato en el flujo, después se sella la columna. La columna sellada se incuba durante al menos 80 minutos, después se lava el SDD-Ins añadiendo simplemente 1 CV de tampón de replegamiento.

Ejemplo 5

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (insulina) mediante replegamiento en columna usando el derivado de N^{Pro} de las SEC ID N° 2, 3 o 4, respectivamente

Para este experimento se usa un constructo análogo al descrito en el ejemplo 4. Este polipéptido de fusión comprende una forma mutante marcada con 6x histidina en N-terminal de la autoproteasa N^{Pro} (SEC ID N° 2, 3, 4 respectivamente), seguido por un ligador SDD (serina, ácido aspártico, ácido aspártico) y la secuencia de la

proinsulina.

5.1 Construcción de plásmidos

5 La construcción de los plásmidos se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.1.

5.2 Transformación

10 La transformación de las células huésped se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.2.

5.3 Expresión y fermentación

La expresión y fermentación de los plásmidos se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.3.

15 5.4. Escisión en columna de insulina

La escisión en columna de la insulina se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.4 con resultados similares.

20 Ejemplo 6

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*) mediante replegamiento usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 5 (EDDIE)

25 Para este experimento se usa el constructo pET30-EDDIE-sSpA-D para expresar la proteína de fusión EDDIE-sSpA-D. Esta proteína de fusión comprende una forma mutante de la autoproteasa pestiviral N^{Pro} con (SEC ID N° 5) (EDDIE), seguido del dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*.

30 6.1 Construcción del plásmido

Un codón optimizado de la secuencia de ADN para el dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SEC ID N° 25):

35 GCAGACGCACAACAGAAIAAGT-TTAACAAAGACCAGCAGAGCGCATTCTACGAAATTCT
GAACATGCCGAATCTGAATGAGGAACAACGTAATGGCTTTATTTCAGTCTTTAAAAGACG
ACCCATCTCAGAGCACCAACGTTCTGGGCGAAGCAAAGAACTGAACGAATCTCAGGC
ACCAAAA

se ensambla mediante PCR para seis oligonucleótidos solapantes.

40 SpAD1 Spe (SEC ID N° 26):
ATATACTAGTTGCGCAGACGCACAACAGAATAAGTTTAACAAAGACCAGCAG;

45 SpA-D2 (SEC ID N° 27):
CATGTTTCAGAATTTTCGTAGAATGCGCTCTGCTGGTCTTTGTTAAACTTAT;

SpA-D3 (SEC ID N° 28):
CATTCTACGAAATTCTGAACATGCCGAATCTGAATGAGGAACAACGTAAT;

50 SpA-D4 (SEC ID N° 29):
GGGTCGTCTTTAAAGACTGAATAAAGCCATTACGTTGTTCCCTCATTAG;

SpA-D5 (SEC ID N° 30):
TCAGTCTTTAAAAGACGACCCATCTCAGAGCACCAACGTTCTGGGCGAAG;

55 SpA-D6 Sal (SEC ID N° 31):
TTTTGGTGCCTGAGATTTCAGTTTCTTTGCTTCGCCGAGAAGTT

60 en una reacción de PCR de 50 µl con 5 unidades de ADN polimerasa Taq (Biotherm Kat. Nr. GC-002, Genecraft GmbH, Raiffeisenstr. 12, 59348 Ludinghausen, Germain), 1x tampón de PCR (de Biotherm, Genecraft), 20 nmol de mezcla de cada dNTP (GC-013-002, Genecraft) usando el programa siguiente: Incubación inicial a 94 °C, 3 minutos, 25 ciclos de 94 °C, 30 segundos, 54 °C, 30 segundos, 68 °C 30 segundos, y una incubación final a 68 °C durante 7 minutos. 1 µl de la primera PCR se amplifica directamente en una reacción de PCR estándar de 50 µl con 50 pmol de cebadores 5'- y 3'- flanqueantes (SpA-D1 Spe y SpA-D6_Sal). El éxito del procedimiento de ensamblaje génico se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de un modo conocido per se. El producto de PCR sSpA-D purificado se digiere con Spel y Sall y s elija en pET30-EDDIE-6Ha desfosforilado (para la construcción véase

65

1.1.2) de acuerdo con procedimientos estándar. La transformación en la cepa de *E. coli* DH5alpha (# 10643-013, Invitrogen catálogo 2003, Invitrogen Life Technologies Corporation, 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482 Carlsbad, California 92008), se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.2. El aislamiento del ADN del plásmido de clones seleccionados de un modo conocido per se y el análisis de la secuencia de ADN como se conoce en la técnica verifican pET30-EDDIE-sSpA-D.

6.2 Transformación

La transformación de las células huésped se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.2.

6.3 Expresión y fermentación

La expresión y fermentación de los plásmidos se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.3.

6.4 Escisión del dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*

La escisión del dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus* se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 1.5.

Ejemplo 7

Generación del derivado de acuerdo con la SEC ID N° 32 (EDDIEN35T,T158S; asparagina 35 sustituido por treonina, y la treonina 158 sustituida por serina):

Comenzando con el derivado que comprende SEC ID N° 5 (EDDIE), un derivado en el que la adición N35 está sustituida por T y T 158 está sustituida por S se construye mediante PCR mutacional como se describe en 1.1.2. Se realizan dos etapas consecutivas usando los pares de cebadores: 5'_N35T (5'CTC TTT TTG GGA CCC CGT CCG AAG TG3) y 3'_N35T (5'CAC TTC GGA CGG GGT CCC AAA AAG AG3') así como E 5'_T158S (5'GGA CCC GTA ACA GCA CTA ACT GTC C3') and E 3'_T158S (5'GGA CAG TTA GTG CTG TTA CGG GTC C3'). El fragmento resultante se usa para sustituir EDDIE en el vector 6H-EDDIE-Ins-pet30a mediante los sitios de restricción NdeI y SpeI. La secuencia de ADN del derivado EDDIEN35T,T158S se verifica mediante secuenciación del ADN.

Ejemplo 8

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (insulina) usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 33

8.1 Generación del derivado de acuerdo con la SEC ID N° 33:

1 ng de EDDIEN35T,T158S-Ins-pet30a se usa para mutagénesis aleatoria con el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph PCR II kit (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA, Cat#200550 catálogo 2005). Con detalle, 5 µl de tampón (GeneMorphII), 1 µl de mezcla de dNTP 40 Mm ((GeneMorphII), 2,5 µl (103 ng de cada uno) de la mezcla de cebadores IF-NpNde-F (5'-AAG GAG ATA TAC ATA TGG AAC TCA ATC ATT TCG AAC TG-3') y IF-Np-Ins-Spe-R (5'-TAA CGA AGC AAC TAG TGA CCC ACA GTG GAC AGT TAG T-3'), 1 µl de Mutazyme® (GeneMorphII), 1 ng de EDDIEN35T, T158S-Ins-pet30a, A. dest. Adición de 50 µl. Esta mezcla se somete al siguiente programa de PCR: 1 min a 94 °C; etapa 1 a 30: 30 segundos 94 °C, 30 segundos 55 °C, 1 minuto, 72 °C; etapa final: 10 minutos 72 °C; retención 10 °C. La reacción con la cantidad dada de ADN conduce a 4 mutaciones por gen de N^{Pro} de media. Tras la PCR, la mezcla de reacción se purifica usando el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse 1,040724 Hilden, Cat#281 04, Qiagen guía de productos 2005) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

8.2 Construcción de plásmidos

La construcción de los plásmidos se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.1. Los fragmentos generados de acuerdo con 8,1 se usan para sustituir al gen N^{Pro} en el plásmido EDDIE-Ins-pet30a mediante los sitios de restricción NdeI y SpeI, creando de este modo un conjunto de mutagénesis aleatoria de derivados de N^{Pro}.

8.3 Transformación

La transformación de las células huésped se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.2.

8.4 Expresión y fermentación

La expresión y fermentación de los plásmidos se realiza de forma análoga al procedimiento descrito en 4.3.

8.5 Análisis de la escisión

El análisis de la escisión se realiza como se describe en 1.5.

5 Ejemplo 9

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (proinsulina) usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 32

10 Como alternativa, el derivado de acuerdo con la SEC ID N1 32 se puede usar en el procedimiento descrito anteriormente. El derivado se produce como se ha descrito en el Ejemplo 7.

Las etapas descritas en 8,2 a 8.5 se realizan de forma análoga para el derivado con la SEC ID N° 32.

15 Ejemplo 10

10.1. Generación de derivados de treonina-serina de EDDIE:

20 Para aumentar adicionalmente a la polaridad de EDDIE, los aminoácidos treonina (T) en las posiciones 109, 114, 155, 158 y glutamina (Q) 143 se sustituyen por Serina (S) mediante ensamblaje génico. A este gen para EDDIE se divide en el siguiente conjunto de 15 oligonucleótidos solapantes y se ensamblan mediante PCR como se describe en 6.1:

Lista de cebadores:

- 25 e1 ; CAATCATTICGAACTGCTCTACMMCTAGCAAGCMAAACCTGTTGGCGTTGAAGAGCCG
- e2; GGAATCCGTCCGAAGTGCACCCCCAGTCAACCCTCAAGCTTCCCCATGACCCGCGGAG
- e3; GCTGCGGATCTGCCTCGTAAAGGCGATTGTCGCTCTGGAAAC
- e4; GGGCATTIACATTAACCAGGTCCCGTCTATTACCAAGACTACACTGGTCCGGTnACCATC
- 30 e5agc; GTGCACCTCTGGAATTCTnGATGAAAGCCAATnGAGGAAAGCACTAAACGTATTGGCCGTGTAAC
- e6; CTGTACCACATCTACGTGGAGGTTGATGGCGAGATCCTGCTG
- e7agc; CCCCTCGCACCCCTGAAATGGAGCCGTAACAGCACTAACTGTCCACTGTGGGTC
- e8; GTAGAGCAGTTCGAAATGATTGAGTTCATATGTCGCG
- e9; CACTTCGGACGGATTCCCMAAAGAGGACGACCTGCAGTATCGTAGACCGGCTCTTCAACGCCAACAG
- 35 e10; GAGGCAGATCGCGCAGCGTTGTTICAATGTCATCTTCTCCGCGGTCATGGGAAG
- e11; CTGGTnAATGTAAATGCCCGACACCGGACCTAGGTGGTnCCAGAGCGACAATCGCCTTTAC
- e12; CAAAGAATICCAGAGGTGCACGATGGTAAACCGGACCCAGTG
- e13; CTCCACGTAGATGTGGTACAGTnCCCCTCCGAACCGGTTACACGGCCAATACGTnAG
- e14agc; CCATTTACAGGGTGCAGGGGTTCCGCGCTTCGCGCnnCAGCAGGATCTCGCCATCAAC
- 40 e15; CGCAGAGATGTIGGTGACGCTGCAACTAGTGACCCACAGTGGACAGTTAG

45 El fragmento resultante se usa para sustituir el gen de N^{Pro} es s-Np-6H-pet30a mediante los sitios de restricción NdeI y SpeI. La secuencia de ADN del derivado 92 se verifica mediante secuenciación del ADN. La transformación en células bacterianas y la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de la escisión se realiza como se describe en 1.5.

N°	Cambios DE aminoácidos en el derivado N ^{Pro}
34	R53E, G54D, R57E, A1 09S, C112E, V114S, C134E, C138E, L143S, 1155S, F158S

SEC ID 34

50 (1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIEn
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYKPGPVYQDYTGVPVYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEI LLSAKRGTPTLKWRSRNSTNCPPLWWTSC-(168).

Derivados de EDDIE 143:

55 Para intercambiar el aminoácido S143 con una serie de otros aminoácidos polares (D, G, H, K, N, Q), el oligonucleótido e14 se sustituye por el oligonucleótido degenerado e14vaw que contiene la composición de nucleótidos VAW para el codón en la posición 143 (V: ACG; W:AT). Dado que e14vaw es un oligonucleótido inverso que contiene el triplete complementario inverso WTB.

60 e14vaw;CCATTTACAGGGTGCAGGGGTTCCGCGCTTCGCWBTBTTTCAGCAGGATCTCGCCATCAAC

El mismo procedimiento de ensamblaje génico e inserción en s-Np-6H-pet30a tuvo como resultados los mutantes descritos en la tabla de mutantes.

5 La transformación en células bacterianas y la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de la escisión se realiza como se describe en 1.5.

Tabla de mutantes:

Nº	Cambios de aminoácidos en el derivado N ^{Pro}
35	R53E, G54D, R57E, A109S, C112E, V114S, C134E, C138E, L143N, 1155S, F158S
36	R53E, G54D, R57E, A109S, C112E, V114S, C134E, C138E, L1430, 1155S, F158S
37	R53E, G54D, R57E, A109S, C112E, V114S, C134E, C138E, L143H, 1155S, F158S
38	R53E, G54D, R57E, A109S, C112E, V114S, R120C, C134E, C138E, L143Q, 1155S, F158S

10 SEC ID 35

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETI
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGVPVYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEI LLK**NA**KRGTPRTLK**WSRNST**NCPLWVTSC-(168).

15 SEC ID 36

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETI
LRDLPRKGOCSRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQOYTGVPVYHRAPLEFFOESQFEESTKRIGRV
TGSOGKLYHIYVEVOGEI LLK**DA**KRGTPRTLK**WSRNST**NCPLWVTSC-(168).

20 SEC ID 37

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYOTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEOOIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGVPVYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRV
TGSDGKLYHIYVEVDGEILLK**HA**KRGTPRTLK**WSRNST**NCPLWVTSC-(168).

25 SEC ID 38

(1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEOOIETT
LRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYQDYTGVPVYHRAPLEFFDESQFEESTKRIG**CV**
TGSDGKLYHIYVEVDGEI LLK**QA**KRGTPRTLK**WSRNST**NCPLWVTSC-(168).

30 Construcción de sNp-FVN-6H-pet30a

Para insertar el péptido FVN-6H que contiene los primeros tres aminoácidos de la insulina y la cola de 6His ((FVNVDKLAALAEHHHHHH) N^{Pro} se amplifica del plásmido s-Np-6H-pet30a con el par de cebadores FVN R Sal (5'-GAG AGT CGA CGT TAA CGA AGC AAC TAG TGA CCC ACA GTG-3') y el cebador N^{Pro} -F-NdeI (SEC ID N° 20) mediante una reacción de PCR estándar y los fragmentos resultantes se usan para sustituir N^{Pro} 6H mediante los sitios de restricción NdeI y Sail mediante procedimientos estándar creando el plásmido sNp-FVN-6H-pet30a.

Ejemplo 11

40 **Producción de un polipéptido heterólogo de interés (dominio D doble de la proteína A de *Staphylococcus aureus*) usando el derivado de N^{Pro}-de acuerdo con la SEC ID N° 5 (EDDIE) y el derivado de N^{Pro}-que contiene las sustituciones de aminoácidos C134E y C138E**

11.1 Construcción de pET30-6H-EDDIE-sSpA-D-sSpA-D

45 El dominio D de la proteína A de *Staphylococcus aureus* generada mediante ensamblaje génico (véase el Ejemplo 6) se amplifica mediante PCR de pET30-EDDIE-sSpA-D (6.1) mediante el uso del par de cebadores (SpA-D1;GCAGACGCACAACAGAATAAGTTTAAC and SpA-D6;TTTTGGTGCCTGAGATTTCGTTTCAGTTTCTTTGCTTCGCCAGAACGTT) usando esencialmente las mismas condiciones de reacción de PCR que en el Ejemplo 6 y se someten a un procedimiento de ensamblaje del dominio. En una primera etapa, los dominios únicos se unen mediante PCR con un par ligador-cebador (SpA-Dlink2RC; CTGCTGGTCTTTGTTAAAC- TTATTCTGTTGTGCGTCTGCTTTTGGTGCCTGAGATTTCGTT C y SpA-DUnk; GAACGAATCTCAGGCACC- AAAAGCAGACGCACAACAGAATAAGTTTAACAAAGACCAGC AG). En esta reacción de PCR, la concentración del ligador-cebador se reduce a 0,5 pmol, mientras que la del molde (domino D sencillo) está elevado a 10-25 pmol. El ligador-cebador inverso se fija a una secuencia complementaria inversa del extremo 5' al extremo 3' del monómero y el ligador-cebador directo se fija a una secuencia complementaria inversa del extremo

3' al extremo 5', respectivamente. Estos nuevos extremos 5' y 3' del dominio D se hibridan con las secuencias de unión complementarias 3' y 5' de otro dominio D, respectivamente. Por tanto, muchas unidades de un dominio específico se unen entre sí produciendo genes sintéticos con múltiples repeticiones del dominio D. Para permitir el posterior aislamiento y clonación y eliminar los extremos 5' y 3' unidos durante la primera reacción de PCR se incorporan sitios de anclaje y restricción mediante una segunda PCR con el par adaptador-cebador. fish-R-Sal-SpA;GATCTTCAGGTTGGTCAAGTGGGTCGACTTATTTTGGTGCCTGAGATTGTTTCAGT TTC y fish2-F-Spe-SpA;gagaGAAGAgTGGCTACTGTAgAG ACTAGTTGCGCAGACGCACAACAGAATAAGTTTAAC. Un décimo de la primera reacción de PCR se añade directamente a la segunda mezcla de PCR que contiene el adaptador-cebador 0,5 pmol. Los productos de reacción se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos que contiene el doble dominio D extraídos del gel mediante el kit QIAquick Gel Extraction. Los genes del dominio D doble se amplifican mediante PCR usando 50 p mol de anclaje-cebadores ((fish2-F;gagaGAAGAgTGGCTACTGTAgAG and fish-R;GATCTTCAGGTTGGTCAAGTGG), se purifican mediante electroforesis en gel y se digieren con SpeI/SalI y se clonan en pET30-6H-EDDIE-Ins digerido con las mismas enzimas, lo que tiene como resultado una sustitución de la secuencia de la proinsulina con la secuencia del dominio doble D, de modo que da lugar al constructo pET30-6H-EDDIE-sSpA-D-sSpA-D (fusión de EDDIE con el dominio doble D de la proteína A de *Staphylococcus aureus*).

11.2 Expresión de pET30-6H-EDDIE-sSpA-D-sSpA-D

La transformación en células bacterianas, la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de la escisión realizado como se describe en 1.5 revela que, además de la proteína N^{Pro}-EDDIE escindida y el dominio doble D, la mayoría de la proteína de fusión sin escindir (aproximadamente un 90 por ciento) también se encuentra en la fracción soluble. Por tanto, se considera usar el derivado de N^{Pro} que contiene las sustituciones de aminoácidos C134E and C138E que mostraron una velocidad de escisión *in vivo* muy baja.

11.3 Construcción de pET30-N^{Pro}C134E/C138E-sSpA-D-sSpA-D

La secuencia de ADN de N^{Pro}C134E/C138E se amplifica con el par de cebadores IF Np-Nde-F (5'AAGGAGATATACATAT- GGAAGTCAATCATTTGGAAGT3') y IF Np SpAD-Spe-R (5'CGTCTGCGCAACTAGTGACCCACAGT- GGACAGTTAGT3') cortados con las enzimas de restricción NdeI/SpeI y se inserta en el vector pET30-6H-EDDIE-sSpA- DsSpA-D digerido con NdeI/SpeI, reemplazando de este modo 6H-EDDIE con N^{Pro}C134E/C138E y dando lugar al constructo pET30-N^{Pro}C134E/C138E-sSpA-D-sSpA-D.

11.4 Expresión de N^{Pro} C134E, C138E-sSpA-D-sSpA-D

La transformación en células bacterianas, la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de escisión realizado como se ha descrito en 1.5 revela que la mayoría de la proteína de fusión sin escindir se encontraba en la fracción insoluble tras la rotura celular mediante prensa francesa. Este resultado muestra que mediante el uso de diferentes derivados de N^{Pro} se puede controlar la cantidad de escisión *in vivo*, velocidades y dirección de la expresión de las proteínas de fusión en los cuerpos de inclusión. Además, el replegamiento de N^{Pro}C134E/C138E-sSpA-D-sSpA-D muestra, además, una escisión *in vivo* de caso cero y aproximadamente un 33 % de los productos escindidos *in vitro*.

Ejemplo 12:

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (JAC, una diana directa del factor de transcripción oncogénico Jun) usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 5 (EDDIE)

12.1 Construcción de 6H-EDDIE-JAC

El gen para JAC, una diana directa del factor de transcripción oncogénica Jun que está implicado en la transformación celular y la tumorigénesis se amplifica a partir de un clon de ADNc pAC01 (Markus Hartl y col., JAC, a direct target of oncogenic transcription factor Jun, is involved in cell transformation and tumorigenesis. PNAS 98,13601-13606,2001) mediante PCR con los cebadores oligonucleotídicos JAC1 (GATCACTAGTTGCATGCCCAACGGAGG) y JAC2 (GATCGTCG- ACTTAGTTGCCACAGCCACA) que contiene los sitios de restricción SpeI y SalI de acuerdo con el protocolo descrito en 1.1.1. El fragmento resultante se usa para sustituir el gen de la insulina de 6H-EDDIE-Ins-pet30a para crear 6H-EDDIE-JAC-pet30a. Las secuencias de los constructos se verifican mediante secuenciación de ADN de acuerdo con técnicas estándar.

La transformación en células bacterianas y la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de la escisión se realiza como se describe en 1.5.

Ejemplo 13:

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (interferón alfa 1, IFNA1) usando el derivado de N^{Pro} con la SEC ID N° 5 (EDDIE)

5

13.1 Construcción de 6H-EDDIE-sIFNA1-pet30a:

El gen que codifica IFNA1 (número de registro en genbanl NM_024013) se ensambla mediante PCR como se ha descrito (10.1) usando el siguiente conjunto de oligonucleótidos:

10

IFNA1-1 ATA TAC TAG TIG CAT GGCACC GAC CTC T
 IFNA1-2 AM TGG CAT TGC AGC TIA ACA GAA CTA ATG CCG TCA GAA AGG CAG AGG TCG GTG CCA TGC

15

IFNA1-3 GTI CTGTIAAGC TGC AATGCCATITGT TCTTIA GGC TGC GAT CTG CCACAAACC CAC TCT
 IFNA1-4 CAT TIG TGC CAG CAG ACG TAA GGC ACG CGT ATG GGC CAG AGA GTG GGT nG TGG CAG ATC
 IFNA1-5 CTT ACG TCT GCT GGC ACA AAT GCG TCG CAT TAG CCC ATI CTC TIG TCT GGA TCA TCG CCG
 IFNA1-6 TGG TIA CCA CCA AAG GCC TCG TGC GGA GAG CCG AM TCA CGG CGA TGA TCC AGA CAA GAG
 IFNA1-7 GAG GCC TTI GGT GGT AAC CAA GTC CAA AAG GCC CAG GCA ATG GCC TIA GTG CAT GAG ATG
 IFNA1-8 TGC CCT CCG TGC TGA ATA ACT GAA AGG TCT GTI GCA GCA TCT CAT GCA CTA AGG CCA TIG
 IFNA1-9 GTI ATI CAG CAC GGA GGG CAG CGC AGC GGC CTG GAA TGA AAG CTI ACT GCA CCA ATI TIG
 IFNA1-10 TCT AAA TCG CGC AGT TGT TGG TCC AGA CCG GTA CAA AAT TGG TGC AGT AAG CTI TCA TIC
 IFNA1-11 ACC AAC MC TGC GCG An TAG AAG CCT GCG TCA TGC AAG AAG CGG GCT TAG AAG GTA CCC
 IFNA1-12 ATA CTI GCG CAC CGC TAA AAT AGA GTC TIC CTC TAA TAA TGG GGT ACC TIC TAA GCC CGC
 IFNA1-13 CTC TAT TTI AGC GGT GCG CAA GTA TTT CCA TCG TTT AAC CTT ATA CTt ACA GGA AAA ATC
 IFNA1-14 ACG ATC TCC CAT GCG CAC GGG CTG TAA GAT TTT TCC TGT MG TAT AAG GTI AM CGA TGG
 IFNA1-15 GTG CGC ATG GGA GAT CGT TCG CGC GGA GGT CAT GCG TAG CTI CAG CAG CTC TCG TAA TCT
 IFNA1-16 ATA TGT CGA CTT ATT CCT TCT TAC GCA GAC GGT cn GCA GAT TAC GAG AGC TGC TGA AGC

30

El fragmento resultante se digiere con las enzimas de restricción Spel y Sall y se usan para sustituir el gen de la insulina de 6H-EDDIE-Ins-pet30a para crear 6H-EDDIE-sIFNA1-pet30a Las secuencias de los constructos se verifican mediante secuenciación de ADN de acuerdo con técnicas estándar.

35

La transformación en células bacterianas y la expresión y fermentación se realizan como se describe en 4.2 y 4.3. El análisis de la escisión se realiza como se describe en 1.5.

Ejemplo 14:

Producción de un polipéptido heterólogo de interés (hepcidina) usando 6H-EDDIE-Ins:

40

La secuencia de ADN de hepcidina se amplifica mediante PCR a partir del molde "huhep in pCR2.1" (S. Ludwiczek, Department of Internal Medicine, University of Innsbruck) usando el par de cebadores "Hep25 F Spe"(5'-TCG ACT AGT TGC GAC ACC CAC TTC CCC ATC-3')/"Hep R Sal" (5'-ATC GTC GAC TTA CGT CTT GCA GCA CAT CCC AC-3').

45

El fragmento de ADN resultante se digiere mediante Spel/Sall y se clona en pET30-6H-EDDIE-Ins digerido con las mismas enzimas, lo que tiene como resultado una sustitución de la secuencia de la proinsulina con la secuencia de hepcidina 25, de modo que da lugar al constructo pET30-6H-EDDIE-Hep25 (fusión de EDDIE con la hepcidina madura).

50

La transformación de pET30-6H-EDDIE-Hep25 en BL21-CodonPlus(DE3)-RIL de células bacterianas de E. coli (Cat. Nr. 230245, Stratgene, 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA, 2004 Catalog), su expresión y fermentación se realiza como se ha descrito en 4.2 y 4.3. Después de la recolección de células, la rotura de células, aislamiento de IB, la renaturalización y el análisis de la escisión se realizan como se ha descrito en 1.5. Los resultados muestran una escisión de aproximadamente el 80 % de EDDIE-Hepcidina 25-

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. La autoproteasa N^{Pro} del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) que tiene actividad autoproteolítica, en la que al menos un residuo de cisteína de la autoproteasa N^{Pro} de CSFV natural seleccionada del grupo que consiste en C112, C134 y C138 está sustituido por un residuo de ácido glutámico.
2. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- 10 SEC ID N° 2:
 (1)-M ELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRT
 LRDLPKRGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPYHRAPLEFFDEAQFEEVTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVDG
 EI LLLKAKRGTPRTLKWIRNFTNCPLWWTSC-(168)
- 15 3. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que la adición de los residuos de cisteína sustituidos, al menos un residuo de aminoácido básico se sustituye con un residuo de aminoácido básico.
4. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 3, en la que además de los residuos de cisteína sustituidos se intercambian los aminoácidos siguientes: R 53 con E, G 54 con D, R 57 con E, y L 143 con Q.
- 20 5. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- SEQ ID N° 3
 25 (1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIETT
 LRDLPKRGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPYHRAPLEFFDEAQFEEVTKRIGRVTGSDGKLYH
 IYVEVDGEILLKQAKRGTPRTLKWIRNFTNCPLWWTSC-(168).
- 30 6. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que la adición de los residuos de cisteína sustituidos, al menos un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo hidrófilo.
7. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 6, en la que además de los residuos de cisteína sustituidos, los aminoácidos siguientes están sustituidos por T: A109, V114, 1155 y F158.
- 35 8. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- SEC ID N° 4
 40 (1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGN PSEVH PQSTLKLPHDRGRGDIETT
 TLRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPYHRAPLEFFDETQFEEV-TIKRIGRVTGSDGKLYH
 IYVEVDGEILLKAKRGTPRTLKWTRNTTNCPLWV TSC-(168)
- 45 9. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en la que además de los residuos de cisteína sustituidos se han intercambiado los aminoácidos siguientes: A109, V114, 1155 y F158 by T, R 53 con E, G 54 con 0, R 57 con E, y L 143 con Q.
10. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- 50 SEC ID N° 5:
 (1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET
 TLRDLPRKGDRCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPYHRAPLEFFOETQFEETTKRIGRVTGSOGKLYHIYVEVO
 GEILLKQAKRGTPRTLKWTRNTTNCPLWWTSC-(168).
- 55 11. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 9, en la que además se han intercambiado los siguientes aminoácidos: N35 por T y T158 por S.
12. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- 60 SEC ID N° 32:
 (1)-MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGTPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET TLRDLPRKGDRCRSGNH
 LGPVSGIYI KPGPVYYQDYTGVPYH RAPLEFF
 DETQFEETTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGTPRTLKWTRNSTNCPLWV
 65 TSC-(168).

13. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 11, en la que además se han intercambiado los siguientes aminoácidos: A28 por E, S71 por F y R150 por H.

14. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 33:

(1)-MELNH FELYKTSKQKPVGVVEEPVYDTEGRPLFGTPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET
TLRDLPRKGDCRFGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDETQFEETTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVD
GEI LKQAKRGTPHTLKWTRNSTNCPLWVTSC-(168).

15. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos uno de los aminoácidos siguientes se han sustituido además de los residuos de cisteína sustituidos: arginina (R) 53, glicina (G) 54, arginina (R) 57, treonina (T) 109, 114, 155, 158 y leucina (L) 143.

16. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos uno de los aminoácidos siguientes se han sustituido además de los residuos de cisteína sustituidos: arginina (R) 53 con ácido glutámico (E), glicina (G) 54 con ácido aspártico (D), arginina (R) 57 con ácido glutámico (E), treonina (T) 109, 114, 155, 158 con serina (S) y leucina (L) 143 con glutamina (Q) o asparagina (N) o ácido aspártico (D) o serina (S) o histidina.

17. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 34:

(1)MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET
TLRDLPRKGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFF
DESQFEESTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVDGEI LKSAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWVTSC-(168).

18. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 35

(1)MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET
TLRDLPRKGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDESQFEESTKRIGRVTGSDGKLYH
IYVEVDGEILLKNAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWVTSC-(168).

19. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 36

(1)MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET
TLRDLPRKGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFF-
DESQFEESTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVDGEI LKDAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWV-
TSC-(168).

20. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 37

(1)M ELN HFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET TLRDLPRKGDCRSGN
HLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYH RAPLEFF-
DESQFEESTKRIGRVTGSDGKLYHIYVEVDGEILLKHAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWV-
TSC-(168).

21. La autoproteasa N^{Pro} de CSFV de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

SEC ID N° 38

(1)MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGEDDIET –
TLRDLPRKGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFF-
DESQFEESTKRIGCVTGSDGKLYHIYVEVDGEILLKQAKRGTPRTLKWSRNSTNCPLWV-
TSC-(168).

22. Un procedimiento para la producción recombinante de un polipéptido heterólogo de interés, que comprende

(i) cultivo de una célula huésped bacteriana que se transforma con un vector de expresión que comprende

una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, comprendiendo el polipéptido de fusión una autoproteasa N^{pro} de CSFV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un segundo polipéptido que está conectado con el derivado en el extremo C del primer polipéptido de un modo tal que el segundo polipéptido es capaz de ser escindido del polipéptido de fusión mediante la actividad autoproteolítica de la autoproteasa, y siendo dicho segundo polipéptido un polipéptido heterólogo, en el que el cultivo se produce en condiciones que causan la expresión del polipéptido de fusión y la formación de los correspondientes cuerpos de inclusión citoplasmáticos.

- 5
- (ii) aislamiento de los cuerpos de inclusión de la célula huésped,
- (iii) solubilización de los cuerpos de inclusión aislados,
- 10 (iv) inducción de escisión autoproteolítica del polipéptido heterólogo del polipéptido de interés del polipéptido de fusión, y
- (v) aislamiento del polipéptido heterólogo de interés escindido.

15 23. Uso de la autoproteasa N^{pro} de CSFV de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 21 en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22.