

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 413**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**C12N 9/48** (2006.01)

**C12N 15/80** (2006.01)

**C07K 14/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2007 E 07847255 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2084179**

54 Título: **Método para preparar carboxipeptidasa activada**

30 Prioridad:

**22.11.2006 EP 06124576**

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

**15.10.2013**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**

**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**NØRGAARD, PER**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 425 413 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para preparar carboxipeptidasa activada

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para preparar carboxipeptidasas activadas y a un método para usar las carboxipeptidasas activadas para la producción de insulina humana madura o análogos de insulina humana en células fúngicas.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La insulina es una hormona polipeptídica producida en las células beta de los islotes de Langerhans. La molécula de insulina activa es una molécula bicatenaria que consiste en una cadena B y una cadena A conectadas por dos puentes de disulfuro. La insulina se sintetiza como una proinsulina de molécula precursora con la estructura B-C-A, donde la cadena del péptido C conecta el residuo de aminoácidos C-terminal en la cadena B con el residuo de aminoácidos N-terminal en la cadena A. La insulina bicatenaria madura se forma por escisión *in vivo* del péptido C en el par de residuos de aminoácidos básicos situados en la unión con la cadena A y B. La cadena A y B están sujetas entre sí por dos puentes de disulfuro entre los residuos Cys A7 y B7 y A20 y B19, respectivamente. Además, la molécula de insulina biológicamente activa tiene un puente de disulfuro interno entre los residuos Cys en la posición A6 y A11.

15

20

[0003] Tras el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, se han descrito numerosos métodos para producir insulina y precursores de la misma en células huésped genéticamente modificadas. Dado que *E. coli* no tiene la maquinaria celular para plegar el polipéptido expresado y establecer los puentes de disulfuro que conectan la cadena A y B en la insulina madura, esta estrategia incluye varios pasos de tratamiento *in vitro*, tal como el establecimiento *in vitro* de los puentes de disulfuro durante el repliegado y la escisión posterior del péptido C.

25

[0004] A diferencia de *E. coli*, las eucariotas contienen la maquinaria necesaria para el plegado y el establecimiento de los puentes de disulfuro y así parece que serían buenos candidatos para la producción de insulina madura en organismos genéticamente modificados. Thim *et al*, en FEBS Letters, volumen 212, número 2,307-312, divulgan la expresión de proinsulina humana y varios precursores de insulina con determinados péptidos C modificados. La patente estadounidense 4 914 026 divulga un proceso para preparar insulina madura en la levadura por inserción del gen de proinsulina humana enlazado a la secuencia líder del  $\alpha$ -factor de levadura en una célula huésped de levadura y cultivando la célula de levadura transformada en un medio nutritivo bajo condiciones donde la proinsulina se expresa y secreta en forma madura.

30

35

[0005] La WO 97/03089 divulga la expresión de precursores de insulina con la fórmula BZA, donde B y A son las cadenas peptídicas A y B de insulina humana enlazadas por al menos un enlace de disulfuro y Z es un polipéptido que comprende al menos un sitio de escisión proteolítica. La WO 90/10075 revela procesos para preparar insulina y análogos de insulina basados en la expresión de un precursor de insulina o análogo de insulina en la levadura, que después de la recuperación inicial del caldo de fermentación se convierten enzimáticamente en insulina madura o análogo de insulina. Las moléculas precursoras comprenden determinados péptidos C modificados y pueden comprender además una extensión N-terminal de la cadena B de insulina. El péptido C modificado y la posible extensión N-terminal del péptido B están diseñados para no ser divididos en la célula de levadura y así los precursores se segregan como péptidos monocatenarios, donde la cadena A y B siguen conectadas por el péptido C modificado pero con puentes de disulfuro correctamente situados. El producto de insulina madura o de análogo de insulina se obtienen entonces por una serie de pasos enzimáticos *in vitro* posteriores para disociar el péptido C y posiblemente la extensión N-terminal. Estos pasos enzimáticos llevan mucho tiempo, son frecuentemente costosos e introducen impurezas adicionales que posteriormente se deben eliminar en pasos posteriores de proceso hacia abajo, como costosos pasos de cromatografía y similares.

40

45

50

[0006] Un proceso para preparar insulina madura en células animales creadas genéticamente que no son capaces de formar naturalmente gránulos secretores se describe en la patente estadounidense n°: 6 348 327.

55

[0007] La WO2008/037735 divulga un método para preparar insulina humana por cultivo de una células fúngica que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor que comprende al menos un sitio de escisión Kex2.

[0008] La WO2007/080256 divulga un método para preparar polipéptidos de insulina madurada mediante la reacción del precursor de insulina con una carboxipeptidasa.

60

[0009] El propósito de la presente invención es desarrollar una cepa de hongos capaz de producir carboxipeptidasas que se activen intracelularmente independientemente de la proteinasa A y B y, además, desarrollar un proceso para preparar insulina madura o análogos de insulina completamente procesados mediante tal carboxipeptidasa alternativamente activada, de modo que se eviten los pasos de proceso de purificación hacia abajo costosos y de larga duración.

65

Resumen de la invención

- 5 [0010] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una carboxipeptidasa activada en una célula fúngica, donde una secuencia de ADN que codifica una proforma modificada de la carboxipeptidasa, que incluye un sitio de escisión Kex2 insertado en una posición de 0 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácidos N-terminal natural en la carboxipeptidasa de tipo salvaje, se expresa bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proforma modificada de la carboxipeptidasa, a partir de lo cual la proforma se escinde en la célula para liberar la forma activa libre de la carboxipeptidasa.
- 10 [0011] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una carboxipeptidasa activada que comprende la expresión en una célula fúngica de una secuencia de ADN que codifica una proforma modificada de la carboxipeptidasa, que incluye un sitio de escisión Kex2 insertado, a partir de lo cual la proforma de la carboxipeptidasa se escinde en la célula para liberar la forma activa libre de la carboxipeptidasa.
- 15 [0012] En una forma de realización de la invención, el método comprende además un paso de aislamiento de la forma activa de la carboxipeptidasa de la célula fúngica.
- [0013] En otra forma de realización de la invención, la célula fúngica tiene un gen PEP4 no funcional (el gen que codifica la proteinasa A).
- 20 [0014] En una forma de realización de la invención, la célula fúngica tiene un gen PEP4 eliminado.
- [0015] El sitio Kex2 insertado en la proforma de la carboxipeptidasa en una posición asegura la escisión eficaz de la proforma de la carboxipeptidasa para formar la forma madura activada de la carboxipeptidasa.
- 25 [0016] En una forma de realización de la presente invención, el sitio Kex2 se une directamente al residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa de tipo salvaje.
- [0017] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce en una posición relativamente próxima al residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa. No obstante, el sitio Kex2 preferiblemente no debería ser de más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos abajo o arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 30 [0018] En una forma de realización de la invención, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos abajo o arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa.
- 35 [0019] En una forma de realización de la invención, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa.
- 40 [0020] En otra forma de realización de la invención, el sitio de escisión Kex2 se introduce a una distancia de 2-30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa.
- [0021] En otra forma de realización de la invención, el sitio de escisión Kex2 se introduce a una distancia de 5-30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa.
- 45 [0022] En otra forma de realización de la invención, el sitio de escisión Kex2 se introduce a una distancia de 5-20 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa.
- [0023] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 2-30, de 2-29, de 2-28, de 2-27, de 2-26, de 2-25, de 2-24, de 2-23, de 2-22, de 2-21 o de 2-20 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 50 [0024] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 3-30, de 3-29, de 3-28, de 3-27, de 3-26, de 3-25, de 3-24, de 3-23, de 3-22, de 3-21 o de 3-20 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 55 [0025] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 4-30, de 4-29, de 4-28, de 4-27, de 4-26, de 4-25, de 4-24, de 4-23, de 4-22, de 4-21 o de 4-20 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 60 [0026] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 5-30, de 5-29, de 5-28, de 5-27, de 5-26, de 5-25, de 5-24, de 5-23, de 5-22, de 5-21 o de 5-20 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 65 [0027] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 1 residuo de aminoácido arriba o abajo del residuo de aminoácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.



- [0050] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 25 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 5 [0051] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 26 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- [0052] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 27 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 10 [0053] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 28 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- [0054] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 29 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 15 [0055] En otra forma de realización, el sitio Kex2 se introduce a una distancia de 30 residuos de aminoácidos arriba o abajo del residuo de ácido N-terminal natural de la carboxipeptidasa.
- 20 [0056] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar insulina humana madura o un análogo de la misma mediante la reacción de un precursor para insulina humana o un análogo de la misma que comprende una extensión C-terminal de la cadena B con una carboxipeptidasa producida por un método según cualquiera de las formas de realización anteriores, por lo cual la extensión C-terminal se escinde para dar insulina humana madura o un análogo de la misma.
- 25 [0057] En un aspecto, la invención se refiere a un método para preparar insulina humana madura o un análogo de la misma que comprende la coexpresión en una célula fúngica de:
- 30 i) una secuencia de ADN que codifica un precursor de insulina humana o un análogo de la misma que incluye una extensión C-terminal de la cadena B y
- ii) una secuencia de ADN que codifica una proforma de una carboxipeptidasa que incluye un sitio de escisión Kex2,
- 35 por lo cual la extensión C-terminal de la cadena B en la molécula precursora de insulina es escindida por la carboxipeptidasa coexpresada y activada en la célula fúngica, a partir de lo cual la insulina humana madura o un análogo de la misma es aislado del medio de cultivo.
- [0058] La carboxipeptidasa puede ser cualquier carboxipeptidasa adecuada. No obstante, en una forma de realización de la invención, la carboxipeptidasa es endógena de la célula fúngica huésped. En otra forma de realización, la carboxipeptidasa es CPY.
- 40 [0059] En una forma de realización del método, el precursor de insulina humana o un derivado análogo comprende la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, la cadena A de insulina humana o un derivado análogo y un péptido C que conecta la cadena B y la cadena A entre sí, donde el péptido C comprende al menos un sitio de escisión Kex2 y donde la cadena B comprende una extensión C-terminal que facilita una escisión Kex2 más eficaz del péptido C en la célula fúngica y que además es capaz de ser escindida con una carboxipeptidasa.
- 45 [0060] La secuencia de aminoácidos fijada al residuo de aminoácido C-terminal de la cadena B será relativamente corta y tendrá típicamente de 1-4 o 1-3 residuos de aminoácidos o, en particular, 2 residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos en esta secuencia serán residuos de aminoácidos hidrofóbicos y se seleccionarán típicamente del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met y Ala.
- 50 [0061] Ejemplos no limitativos de la extensión C-terminal para la cadena B son Leu-Gly; Leu-Ala; Leu-Leu; Leu-Met y Leu-Ile.
- 55 [0062] En una forma de realización de la invención, el péptido C en el precursor de insulina comprenderá un único sitio Kex2 unido directamente al residuo de aminoácido N-terminal en la cadena A para asegurar la escisión en esta posición.
- 60 [0063] En otra forma de realización de la invención, el péptido C comprenderá dos sitios de escisión Kex2 con una secuencia peptídica interpuesta entre los dos sitios Kex2. La longitud y la composición de aminoácidos de la secuencia peptídica entre los dos sitios Kex2 puede variar en tanto en cuanto ésta permita el pliegue del precursor de insulina monocatenario expresado y el establecimiento de los puentes disulfuro situados correctamente en la molécula precursora de insulina.
- 65

[0064] El tamaño del péptido C natural es de 35 residuos de aminoácidos. Así, en un aspecto de la presente invención, la secuencia peptídica entre los dos sitios Kex2 será de aproximadamente la misma longitud que el péptido C natural.

5 [0065] En una forma de realización, la secuencia peptídica entre los dos sitios Kex2 será 1-35, 1-34, 1-33, 1-31, 1-30, 1-29, 1-28, 1-27, 1-26, 1-25, 1-24, 1-23, 1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 residuos de aminoácidos de largo.

[0066] En una forma de realización de la invención, el precursor de insulina humana tiene la secuencia de aminoácidos

10 B(1-30)-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-Z-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-A (1-21)

15 donde B(1-30) es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A(1-21) es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X<sub>1</sub> es una secuencia peptídica de 1-5 residuos de aminoácidos que facilitará una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X<sub>2</sub> es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con de 1 a aproximadamente 35 residuos de aminoácidos o un enlace peptídico, X<sub>3</sub> es un sitio de escisión Kex2 o un enlace peptídico y X<sub>4</sub> es un sitio de escisión de aminopeptidasa o un enlace peptídico.

20 [0067] En una forma de realización de la invención, X<sub>3</sub> es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica y X<sub>4</sub> es un enlace peptídico.

[0068] En otra forma de realización de la invención, X<sub>3</sub> y Z son enlaces peptídicos y X<sub>4</sub> es un sitio de escisión de aminopeptidasa.

25 [0069] X<sub>1</sub> es típicamente de 1-4 o de 1-3 residuos de aminoácidos de largo y en una forma de realización, X<sub>1</sub> es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos en X<sub>1</sub> serán preferiblemente residuos de aminoácidos hidrofóbicos y se seleccionarán típicamente del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met y Ala.

30 [0070] En otra forma de realización, los residuos de aminoácidos en X<sub>1</sub> se seleccionan del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met, Ala, Asp y Gly.

[0071] En una forma de realización de la invención, X<sub>1</sub> es Leu-Ala.

35 [0072] En otra forma de realización de la invención, X<sub>1</sub> es Phe-Leu.

[0073] En otra forma de realización de la invención, X<sub>1</sub> es Leu-Gly.

[0074] En otra forma de realización de la invención, X<sub>1</sub> es Leu-Leu.

40 [0075] En otra forma de realización de la invención, X<sub>1</sub> es Leu-Met.

[0076] En otra forma de realización de la invención X<sub>1</sub> es Leu-Ile.

Breve descripción de los dibujos

45 [0077]

La figura 1 muestra el plásmido ESI42-33.

50 La figura 2 muestra el plásmido pRC1.

La figura 3 muestra el plásmido pSA160.

55 La figura 4 muestra un espectro de masa deconvolucionada de un sobrenadante de cultivo de 24 horas de una cepa que alberga pSA160.

La masa 5763 corresponde a insulina completamente procesada A14E, B25H.

60 La figura 5 muestra un análisis esquemático de la escisión de un precursor de insulina con un sitio Kex2.

La figura 6 muestra la escisión de un precursor de insulina con un sitio Kex2 y un sitio de aminopeptidasa.

Y la figura 7 muestra la escisión de un precursor de insulina con dos sitios Kex2.

65 Descripción detallada de la invención

- [0078] La carboxipeptidasa Y (CPY) se sintetiza en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como una proforma inactiva (proCPY). Después de la translocación de la proteína en retículo endoplasmático (ER), se transporta a la vacuola. A su llegada, se activa por eliminación del propéptido, un evento proteolítico iniciado por la proteinasa A. Dos situaciones evitan la conversión eficaz de proCPY en CPY: 1) si el gen *PEP4* (el gen que codifica la proteinasa A) se elimina o inactiva, todas las CPY estarán en la proforma inactiva, 2) si *PRC1* (el gen que codifica CPY) se sobreexpresa, se segregará una cantidad significativa de proCPY al caldo de fermentación. Permanecerá en la proforma dado que la proteinasa A está localizada en la vacuola y por lo tanto separada de la proCPY segregada. Para permitir la activación eficaz de proCPY en estas situaciones, es necesaria una ruta de activación alternativa.
- [0079] En la interfaz entre el propéptido y la CPY madura se encuentran motivos de secuencia que pueden ser reconocidos por la proteinasa A, dando lugar así a la escisión específica. Tras la escisión, el propéptido se separa de la CPY madura. En la presente invención, se han hecho varios mutantes en los que los residuos cercanos a la interfaz entre el propéptido y la CPY madura se han mutado de manera que se ha insertado un sitio de escisión dibásico reconocido por Kex2p. Esto garantiza la conversión de proCPY en CPY en el aparato de Golgi, donde está localizado Kex2p. Esto elimina la necesidad de proteinasa A en la activación de CPY. Además, los genes mutados se han sobreexpresado para permitir la secreción de cantidades significativas de CPY activa.
- [0080] A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de la prosecuencia de la carboxipeptidasa CPY de tipo salvaje, desde la posición 31 arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural de la enzima de tipo salvaje, y los primeros 9 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de la enzima de tipo salvaje y las secuencias correspondientes de los mutantes A-G, donde se ha insertado un sitio Kex2 (KR) en diferentes posiciones abajo o arriba con respecto al residuo de aminoácido N-terminal. El sitio de escisión para escindir la prosecuencia se indica con una flecha.  
 Tipo salvaje: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQLRVN↓KIKDPKILG (SEC ID N°: 1).  
 Mutante A: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQLRVNKIKR↓DPKILG (SEC ID N°: 2).  
 Mutante B: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQLRVLGKR↓DPKILG (SEC ID N°: 3).  
 Mutante C: LGKRIEFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQLRVNKIKDPKILG (SEC ID N°: 4).  
 Mutante D: KPKFPEAIKTKR↓DWDVVKNDAIENYQLRVNKIKDPKILG (SEC ID N°: 5).  
 Mutante e: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKR↓NDAIENYQLRVNKIKDPKILG (SEC ID N°: 6).  
 Mutante F: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKLDR↓AIENYQLRVNKIKDPKILG (SEC ID N°: 7).  
 Mutante G: KPKFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQLRVNKIKDPKR↓GGILG (SEC ID N°: 8).
- [0081] El término "propéptido" o "prosecuencia", como se utiliza en este caso, se refiere a una secuencia polipeptídica cuya función es facilitar el pliegue y el transporte del polipéptido expresado desde el retículo endoplasmático hasta su destino final en la ruta secretora o extracelularmente. El propéptido además inhibe la actividad enzimática de la carboxipeptidasa.
- [0082] El término "proforma" se refiere al producto de fusión de la prosecuencia y la secuencia polipeptídica activa.
- [0083] La carboxipeptidasa puede ser cualquier carboxipeptidasa que se pueda expresar en una célula fúngica y que pueda ser activada por una enzima Kex2p endógena expresada por la célula fúngica.
- [0084] Ejemplos representativos de carboxipeptidasas son la carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1), la carboxipeptidasa A2 (EC 3.4.17.15), la carboxipeptidasa B (EC 3.4.17.2), la carboxipeptidasa E (EC 3.4.17.10), la carboxipeptidasa M (EC 3.4.17.12), la carboxipeptidasa T (EC 3.4.17.18), la carboxipeptidasa U (EC 3.4.17.20) y la carboxipeptidasa Y (EC 3.4.16.5).
- [0085] En una forma de realización de la invención, la carboxipeptidasa es CPY.
- [0086] Si el sitio Kex2 introducido se une directamente al residuo de aminoácido N-terminal en la carboxipeptidasa, la forma activada será la forma nativa de la carboxipeptidasa.
- [0087] Si el sitio Kex2 no se une directamente al aminoácido N-terminal natural, la carboxipeptidasa liberada contendrá una extensión N-terminal de longitud variable o carecerá de uno o más de los residuos de aminoácidos naturales en el extremo N-terminal dependiendo de la posición del sitio Kex2.
- [0088] La carboxipeptidasa activada puede utilizarse para procesar proteínas de fusión de cualquier tipo.
- [0089] La carboxipeptidasa se puede expresar a partir de cualquier promotor adecuado, incluyendo su propio promotor. No obstante, ha resultado que los niveles de carboxipeptidasa pueden ser demasiado altos, lo que lleva a procesamiento aberrante del precursor de insulina. Para encontrar una proporción adecuada entre el precursor de insulina y la carboxipeptidasa activa, el nivel de expresión de la carboxipeptidasa mutante se puede modular por sustitución del promotor propio de la carboxipeptidasa con promotores alternativos.
- [0090] Si la carboxipeptidasa es la enzima de CPY, entonces los promotores alternativos adecuados son regiones promotoras de los genes de *CYC1*, *KEX2*, *MF(alfa)1* y *MPD1*.

[0091] Alternativamente, la cantidad de la proforma de la carboxipeptidasa se puede regular por modulación de su expresión desde su promotor mediante el cambio de la cantidad de factores de transcripción para el promotor en cuestión.

5

[0092] En una forma de realización de la invención, el promotor para la carboxipeptidasa es el promotor Kex2.

10

[0093] La coexpresión de la proforma modificada de la carboxipeptidasa y un precursor de insulina humana en una célula fúngica permitirá la secreción de insulina humana completamente procesada al caldo de fermentación, sin necesidad de más pasos de procesamiento costosos hacia abajo. El precursor de insulina humana expresado será, como el primer paso, procesado intracelularmente por las proteasas de Golgi Kex1p y Kex2p. El precursor de insulina humana comprende un péptido C que ha sido modificado por la adición de residuos de aminoácidos extra (X) al residuo de aminoácido C-terminal en la cadena B de insulina. Estos residuos de aminoácidos extra están diseñados para facilitar una escisión eficaz del péptido C de la cadena A y B de la molécula de insulina en la célula fúngica. El procesamiento completo por Kex1p y Kex2p produce una molécula precursora de insulina humana bicatenaria con la extensión X del extremo C-terminal de la cadena B. Los precursores tendrán la forma B-(X)<sub>n</sub>.....A, donde B es la cadena B de insulina humana, A es la cadena A de insulina humana y X son los residuos de aminoácidos extra y donde las cadenas A y B están enlazadas por dos puentes de disulfuro como en la insulina humana.

15

20

[0094] Esta insulina humana bicatenaria, C-terminalmente extendida, se convertirá luego en insulina humana madura o un derivado análogo por escisión mediante la carboxipeptidasa coexpresada y activada, que escindirá la extensión C-terminal de la cadena B para dar insulina humana madura bicatenaria o un derivado análogo, según el caso.

25

[0095] Dependiendo del residuo de aminoácido en la posición B30, la carboxipeptidasa también puede quitar el residuo de aminoácido B30, dando como resultado un análogo de insulina humana desB30. La carboxipeptidasa puede además quitar hasta 5 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena B, dando como resultado un análogo de insulina humana desB(29-30), desB(28-30), desB(27-30) o desB(26-30).

30

[0096] Los diferentes modelos de procesamiento del precursor de insulina se ilustran esquemáticamente en las figura 5-7.

35

[0097] En la figura 5, el constructo del precursor de insulina tiene un sitio Kex2 único, KR, y una extensión C-terminal de la cadena B ilustrada por la secuencia XX en el péptido de conexión. El primer paso de procesamiento es la escisión en el sitio Kex2 por Kex2, que convierte la estructura monocatenaria en una estructura bicatenaria que tiene la secuencia XXKR fijada a la cadena B. Posteriormente, la enzima Kex1 escindirá la secuencia KR y finalmente la carboxipeptidasa escinde la extensión XX de la cadena B para dar un producto de insulina bicatenaria madura.

40

[0098] En la figura 6, se ilustra una forma de realización alternativa, donde el precursor de insulina tiene un sitio Kex2 único y un sitio de escisión de aminopeptidasa, YY, en el péptido de conexión. Como en la figura 5, Kex2p, Kex1p y la carboxipeptidasa eliminarán la secuencia XX-KR. No obstante, en esta forma de realización, una escisión de aminopeptidasa final elimina la secuencia YY para dar el producto de insulina bicatenaria madura.

45

[0099] En la forma de realización ilustrada en la figura 7, el precursor de insulina tiene dos sitios de escisión Kex2 conectados por una cadena peptídica Z. La primera escisión con Kex2 elimina la secuencia Z-KR, el Kex1 elimina la secuencia KR y finalmente la carboxipeptidasa elimina la secuencia XX.

50

[0100] La producción de altas cantidades de insulina humana madura o análogo de insulina desde la célula fúngica reducirá significativamente el número de pasos de purificación hacia abajo necesarios para producir un producto de insulina de una pureza suficientemente alta para fines farmacéuticos. Así, en el método para preparar insulina en la levadura descrito en la patente estadounidense n°: 4916212, un precursor de insulina se convierte en insulina humana en dos pasos, es decir, una transpeptidación para convertir el precursor de insulina de cadena única B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) en un éster de insulina humana y luego una hidrólisis del éster de insulina en insulina humana. Cada paso de conversión requerirá un paso de separación inicial y al menos un paso de purificación posterior. Así, al menos seis pasos adicionales son necesarios para producir la insulina madura, incluyendo al menos una conversión enzimática.

55

60

65

[0101] La solicitud de patente europea 0163529A, solicitudes de patente PCT n°: WO 95/02059 y WO 90/10075 revelan procesos para preparar insulina y análogos de insulina basados en la expresión de un precursor de la insulina o análogo de insulina en la levadura, que después de la recuperación inicial del caldo de fermentación son enzimáticamente convertidos en la insulina madura o análogo de insulina. Las moléculas precursoras comprenden determinados péptidos C modificados y pueden comprender además una extensión N-terminal de la cadena B de insulina. El péptido C modificado y la posible extensión N-terminal del péptido B están diseñados para no ser divididos en la célula de levadura y así los precursores se segregan como péptidos monocatenarios donde la cadena A y B están aún conectadas por el péptido C modificado pero con puentes de disulfuro correctamente situados. La insulina madura o producto análogo de insulina se obtiene luego por varios pasos enzimáticos *in vitro* posteriores para escindir el péptido C y posiblemente la extensión de N-terminal. Estos pasos enzimáticos duran mucho tiempo, son frecuentemente

costosos e introducen impurezas adicionales que posteriormente se deben eliminar en más pasos de proceso hacia abajo, tales como costosos pasos de cromatografía y similares.

5 [0102] Se sabe bien que ninguna escisión enzimática se produce hasta un 100% de escisión, dejando impurezas de impurezas no escindidas o parcialmente escindidas que tienen ser eficazmente eliminadas en el caso de los productos farmacéuticos. Así, cada paso de escisión estará seguido de al menos un paso de aislamiento o de purificación, típicamente una purificación cromatográfica por medios de cromatografía de intercambio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similares.

10 [0103] El material de columna cromatográfica para su uso a escala comercial es muy caro y, por lo tanto, la reducción del número de tales pasos cromatográficos tiene un impacto significativo en la economía de la producción. Una reducción de la conversión hacia abajo y un paso de purificación reducirán además la cantidad de trabajo y horas de mano de obra utilizadas en el proceso y así además mejora la economía de la producción.

15 [0104] En el presente proceso, donde la insulina madura o un derivado análogo se puede aislar directamente del caldo de cultivo, son necesarios muchos menos pasos de proceso hacia abajo para producir un producto de pureza suficiente para uso farmacéutico.

20 [0105] La molécula de insulina se puede modificar en la cadena A y/o B en tanto en cuanto tal modificación no tenga un efecto adverso en la actividad insulínica del análogo de insulina resultante.

25 [0106] Así, por "análogo de insulina", como se utiliza en este caso, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente se puede derivar de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo la de insulina humana, por borrado y/o sustitución en al menos un residuo de aminoácido que se produce en la insulina natural y/o por adición de al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos añadidos y/o sustituidos pueden ser bien residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

30 [0107] Los análogos de insulina no comprenderán típicamente más de aproximadamente 7 mutaciones, más típicamente no más de 5 e incluso más típicamente como mucho 3 mutaciones, en comparación con la insulina humana.

35 [0108] A lo largo de los años, se ha descrito un número bastante importante de modificaciones de la cadena A y B de insulina. Así, la posición 28 de la cadena B se puede modificar a partir del residuo Pro natural a Asp, Lys, o Ile y Lys en la posición B29 también se puede modificar a Pro.

40 [0109] También, Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y en particular a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Otros ejemplos de análogos de insulina son insulina humana des(B30), análogos de insulina donde uno o ambos B1 y B2 se han eliminado; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. También, el residuo de aminoácido natural en la posición A18 se puede cambiar a un residuo de Gln o uno o más de los residuos de aminoácido en las posiciones B26-B30 se han eliminado.

45 [0110] Ejemplos de análogos de insulina que se pueden producir por el presente método son insulina humana Gly<sup>A21</sup>, insulina humana Gly<sup>A21</sup> des(B30), insulina humana desB1, insulina humana desB30, insulina humana AspB28 e insulina humana Lys<sup>B28</sup>Pro<sup>B29</sup>.

50 [0111] Otros ejemplos de análogos de insulina son los análogos de insulina humana que contienen mutaciones en una o más de las posiciones A21, B10, A8, A14, B25, B27 y B1.

55 [0112] La célula fúngica puede ser cualquier célula fúngica puesto que todos los hongos tienen la actividad proteolítica necesaria para escindir moléculas precursoras de insulina del presente tipo para escindir el péptido de conexión y liberar una molécula bicatenaria. No obstante, a lo largo de los años, la levadura ha demostrado ser un tipo de célula eficaz para la expresión y secreción de péptidos pequeños del tamaño de la insulina. En particular, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser útil.

[0113] Así, en una forma de realización de la invención, la célula fúngica es una célula de levadura y en otra forma de realización, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

60 [0114] La secuencia de ADN usada en la presente invención puede ser de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, se puede obtener mediante la preparación de una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionar secuencias de ADN que codifiquen para todo o parte del polipéptido por hibridación, usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por

Matthes *et al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, tal y como se describe en la US 4 683 202 o Saiki *et al.*, Science 239 (1988), 487 - 491.

5 [0115] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que se pueda someter a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en que se tiene que introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado.

10 [0116] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina está operativamente enlazado a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar a partir de genes que codifiquen proteínas, bien homólogas, bien heterólogas, de la célula huésped.

15 [0117] Ejemplos de promotores adecuados para su uso en las células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young *et al.*, en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender *et al.*, eds.), Plenum Press, New York, 1982) o los promotores TP11 (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell *et al.*, Nature 304 (1983), 652 - 654).

20 [0118] La secuencia de ADN que codifica el producto deseado también puede estar, si es necesario, operativamente conectado con un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

25 [0119] Para dirigir la insulina en la ruta secretora de las células huésped, puede estar provista una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras están comúnmente situadas 5' para la secuencia de ADN que codifica el péptido. El péptido señal puede ser un péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético.

30 [0120] Para la secreción eficaz en la levadura, una secuencia que codifica un péptido líder también se puede insertar abajo de la secuencia de señal y arriba de la secuencia de ADN que codifica el producto deseado.

35 [0121] Métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos a partir de ellas se describen, por ejemplo, en la US 4 599 311, US 4 931 373, US 4 870 008, 5 037 743 y US 4 845 075. Las células transformadas son seleccionadas por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente la resistencia al medicamento o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo, leucina. Un vector preferido para su uso en la levadura es el vector POT1 descrito en la US 4 931 373.

40 [0122] El medio usado para cultivar las células en el proceso de fermentación puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tal como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según las recetas publicadas (p. ej., en catálogos de la *American Type Culture Collection*). Así, el medio contendrá al menos una fuente de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, sales esenciales, incluyendo sales de potasio, sodio, magnesio, fosfato, nitrato y sulfato, metales traza, vitaminas solubles en agua, ayudas de proceso, incluyendo, pero no limitado a, inhibidores de proteasa, estabilizadores, ligandos, agentes antiespumantes e inductores. El medio puede contener componentes que se precipiten o se dispersen parcialmente en el medio líquido en algunas condiciones de operación, incluyendo esterilización por calor. El medio se puede crear mediante la mezcla de diferentes líquidos y soluciones gaseosas. Estas soluciones se pueden mezclar antes de entrar en el tanque de fermentación o se suministran al tanque de fermentación como corrientes de líquido separadas, adicionadas en una proporción predefinida. La proporción entre diferentes soluciones de líquido de componentes de medio puede variar durante los diferentes estadios del proceso de fermentación, lo que significa que la composición total del medio puede variar durante el curso de la fermentación.

45 [0123] El péptido producido por las células se puede recuperar luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio por centrifugado o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

- 5 [0124] Después del aislamiento del caldo de cultivo, la insulina madura o el análogo de insulina se puede convertir en, por ejemplo, formas aciladas por acilación, en particular, del grupo ε-amino del residuo B29Lys. Los métodos para la acilación de insulinas son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes EP 792 290 y 894 095 y en las patentes US 5 693 609, 5 646 242, 5 922 675, 5 750 497 y 6 011 007.
- [0125] Ejemplos de insulinas aciladas son N<sup>εB29</sup>-tetradecanoil insulina humana des(B30), N<sup>εB29</sup>-litocoloil-γ-glutamil insulina humana des(B30), N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-γ-Glu) insulina humana des(B30) o N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-Glu) insulina humana des(B30).
- 10 [0126] Con "desB30" o "B(1-29)" se entiende una cadena B de insulina natural o un derivado análogo que carece del residuo de aminoácido B30.
- [0127] B(1-30) se refiere a la cadena B natural de insulina humana y "A(1-21)" se refiere a la cadena A de insulina natural. Insulina humana A18Q es un análogo de insulina con un Gln en la posición A18 de la cadena A de insulina humana. B10E, A8H, A14E es un análogo de insulina con un Glu en la posición B10, un His en la posición A8 y un Glu en la posición A14, respectivamente.
- 15 [0128] Con "B1", "A1", etc., se hace referencia al residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica también se puede denominar, por ejemplo, Phe<sup>B1</sup>, que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.
- 20 [0129] Con "péptido C" se hace referencia a la secuencia peptídica que conecta las cadenas de péptido B y A de la molécula de insulina entre sí.
- 25 [0130] Con "insulina madura" se entiende una insulina bicatenaria con la composición de residuo de aminoácido correcta y la misma conformación estructural que la molécula de insulina humana natural, es decir, con puentes disulfuro entre Cys<sup>A7</sup> y Cys<sup>B7</sup> y entre Cys<sup>A20</sup> y Cys<sup>B19</sup> y un puente disulfuro interno entre Cys<sup>A6</sup> y Cys<sup>A11</sup> y con actividad de insulina. Así, una insulina madura según la presente invención sería la insulina humana. Un análogo de insulina humana madura puede ser insulina humana B28Asp, insulina humana desB30, insulina humana A14Glu, B25His e insulina humana B31Leu, B32Ala.
- 30 [0131] Por "derivado de insulina", como se utiliza en este caso, se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que se ha modificado químicamente, por ejemplo por introducción de una cadena lateral en una o más posiciones de la estructura de insulina o por oxidación o reducción de los grupos de los residuos de aminoácidos en la insulina o por acilación de un grupo amino libre o un grupo hidroxilo.
- 35 [0132] Con "Kex2" o "Kex2p" se entiende una endoproteasa tipo subtilisina que cataliza preferentemente la escisión después de una secuencia de dos residuos básicos (lisina o arginina) (Rockwell, NC, Krysan, DJ, Komiyama, T & Fuller, RS 2002 Precursor Processing by Kex2/Furin Proteases. Chem. Rev. 102: 4525-4548).
- 40 [0133] Con "Kex1" o "Kex1p" se entiende una carboxipeptidasa de serina que cataliza preferentemente la eliminación de los residuos de lisilo y/o arginilo C-terminales (Shilton BH, Thomas DY, Cygler M 1997 Crystal structure of Kex1deltap, a prohormone-processing carboxypeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 36: 9002-9012).
- 45 Con CPY se entiende una carboxipeptidasa Y, una carboxipeptidasa que preferentemente cataliza la eliminación de residuos de aminoácidos C-terminales pesados o hidrofóbicos, tal como Phe y Leu (Remington, S.J. & Breddam, K. (1994) Carboxypeptidases C and D. Methods Enzymol. 244, 231-248). La secuencia de aminoácidos de CPY se describe en "Valls *et al.*, 1987, Cell, 48(5): 887-897".
- 50 [0134] Con "correctamente procesado" se hace referencia a una escisión enzimática en el punto de escisión deseado que da el producto deseado con la secuencia de residuos de aminoácidos correcta.
- 55 [0135] "Escisión eficaz" hace referencia a una escisión de al menos 80%, preferiblemente al menos 85% y más preferiblemente al menos 95%.
- [0136] "POT" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe* y "TPI1" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.
- 60 [0137] Por una "líder" se entiende una secuencia de aminoácidos que consiste en un prepéptido (el péptido señal) y un propéptido.
- 65 [0138] El término "péptido señal" se refiere a un prepéptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es permitir que la proteína heteróloga facilite la

translocación en el retículo endoplasmático. El péptido señal normalmente se escinde en el curso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo del organismo huésped que produce la proteína.

5 [0139] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para  $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Varios péptidos señal que se pueden usar con el constructo de ADN de la invención incluyen el péptido señal de proteasa aspártica 3 de levadura (Yps1) o cualquier análogo funcional (Egel- Mitani *et al.* (1990) YEAST 6:127-137 y US 5 726 038) y el  $\alpha$ -factor señal del gen *MFA1* (Thorner (1981) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern *et al.*, eds., pp 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4 870 008), el péptido señal de amilasa salival de ratón (véase O. Hagenbuchle *et al.*, Nature 289, 1981, págs. 643-646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (véase L.A. Valls *et al.*, Cell 48, 1987, págs. 887-897) y el péptido señal BAR1 de levadura (véase la WO 87/02670).

15 [0140] La invención abarca un vector que es capaz de replicar en el microorganismo seleccionado o célula huésped y que lleva una secuencia polinucleótida que codifica los precursores de insulina de la invención. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique con el cromosoma o cromosomas en que los que se ha integrado. Además, se pueden utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se ha de introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón. El vector puede ser plásmidos lineales o cerrados circulares y contendrá preferiblemente un elemento o elementos que permitan la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

25 [0141] En una forma de realización, el vector de expresión recombinante es capaz de replicar en levadura. Ejemplos de secuencias que permiten que el vector replique en la levadura son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de levadura 2  $\mu$ m y el origen de replicación.

30 [0142] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que confiera resistencia a un medicamento, por ejemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

35 [0143] Los marcadores adecuados para células huésped de levadura son *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* y *URA3*. Un marcador seleccionable preferido para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40:125-130).

[0144] En un huésped de levadura, los promotores útiles son los promotores MFA1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

40 [0145] El constructo polinucleótido de la invención estará también típicamente conectado operativamente con un terminador adecuado. En la levadura, un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434).

45 [0146] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para el precursor de insulina, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

50 [0147] Se entenderá que el vector se puede construir preparando primero un constructo de ADN que contiene la secuencia de ADN entera que codifica los precursores de insulina de la invención, y posteriormente insertando este fragmento en un vector de expresión adecuado, o insertando consecutivamente los fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales seguido de ligamiento.

55 [0148] La célula huésped usada en la presente invención es una célula fúngica. "Hongos", como se utiliza en este caso, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como definen Hawkswort *et al.*, en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que Oomycota (como se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

60 [0149] En una forma de realización, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y la levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Las levaduras ascoesporógenas se dividen en las familias Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. La última está compuesta por cuatro subfamilias, Schizosaccharomycoidae (p. ej., género *Schizosaccharomyces*), Nadsonioideae, Lipomycoidae y Saccharomycoidae (p. ej., los géneros *Pichia*, *Kluyveromices* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidioesporogéneas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*,

*Sporidiobolus*, *Filobasidium* y *Filobasidiella*. Las levaduras de los Fungi Imperfecti se dividen en dos familias, Sporobolomycetaceae (p. ej., los géneros *Sorobolomyces* y *Bullera*) y Cryptococcaceae (p. ej., el género *Candida*). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980). La biología de la levadura y la manipulación de la genética de la levadura son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacil, M., Horecker, B.J., and Stopani, A.O.M., editors, 2nd edition, 1987; *The Yeasts*, Rose, A.H., and Harrison, J.S., editors, 2nd edition, 1987; and *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Strathern *et al.*, editors, 1981).

[0150] La célula huésped de levadura se puede seleccionar de una célula de una de las especies de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia*. En una forma de realización, la célula huésped de levadura es una *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida cacaoli* y *Geotrichum fermentans*. Otras células huésped de levadura útiles son una *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Ustilgo maylis*, *Candida maltose*, *Pichia guillermondii* y *Pichia methanoliol* (véase, Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4,882,279 y US 4,879,231).

[0151] La expresión "un aminoácido codificable" o "un residuo de aminoácido codificable" se utiliza para referirse a un aminoácido o un residuo de aminoácido que se puede codificar por un triplete ("codón") de nucleótidos.

[0152] En el presente contexto, las indicaciones de tres letras o de una sola letra de los aminoácidos se han usado en sus significado convencional. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en la presente son L-aminoácidos. Además, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el N- y C-terminos, a menos que se especifique de otro modo.

[0153] Todos los encabezados y subencabezados se usan en este caso sólo por conveniencia y no deberían interpretarse como limitativos de la invención de manera alguna.

[0154] El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (p. ej., "tal como") que se proporcionan en la presente, se destina meramente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación del ámbito de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ningún lenguaje de la especificación debería interpretarse como indicador de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0155] La mención y la incorporación de documentos de patente se hace en la presente sólo por conveniencia y no refleja ningún enfoque de la validez, patentabilidad y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente.

[0156] Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto nombrada en las reivindicaciones anexas, según lo permitido por la ley aplicable.

## Ejemplos

### Procedimientos generales

[0157] Todos los plásmidos de expresiones son del tipo C-POT, similares a los descritos en la EP 171 142. Son vectores de expresión basados en  $2\mu$ , caracterizados por el hecho de que contienen el gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe* (POT) para el propósito de la selección y estabilización del plásmido en *S. cerevisiae*. Los plásmidos también contienen el promotor y el terminador de triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae* (Figura 1). Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en la WO 9010075) como son todas las secuencias excepto las siguientes: 1) la secuencia del fragmento *EcoRI* - *XbaI* que codifica la proteína de fusión de la líder y el producto de insulina y 2) una mutación silenciosa se ha introducido dando como resultado la eliminación de un sitio *NcoI* en la región  $2\mu$  en el vector de expresión. Para facilitar la clonación de diferentes proteínas de fusión, la secuencia de ADN que codifica la pre-pro líder *MFA1* se ha cambiado para incorporar un sitio *NcoI* (véase la figura 2) y se llama la pre-pro líder *MFA1\**. Así, el fragmento *NcoI* - *XbaI* se substituye simplemente por un fragmento *NcoI* - *XbaI* que codifica el constructo de insulina de interés. Tales fragmentos *NcoI* - *XbaI* se pueden sintetizar usando oligonucleótidos sintéticos y PCR según técnicas estándar. Además del líder alfa, se pueden usar otros líderes.

[0158] Se prepararon transformantes de levadura por transformación de la cepa de *S. cerevisiae* MT663 o ME1719 de cepas huéspedes. La cepa de levadura MT663 (MATa/MAT $\square$  pep4-3/pep4-3 HIS4/his4  $\Delta$ tpi::LEU2/ $\Delta$ tpi::LEU2 Cir) fue depositada en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* en conexión con el depósito de la WO 92111378 y se le asignó el número de depósito DSM 6278. La cepa de *S. cerevisiae* ME1719 (MATa/ $\square$  leu2/leu2 pep4-3/pep4-3  $\Delta$ tpi::LEU2/ $\Delta$ tpi::LEU2  $\Delta$ ura3/ $\Delta$ ura3  $\Delta$ yps1::URA3 /  $\Delta$ yps1::ura3 Cir+) se describe en la WO 98/01535.

[0159] MT663 o ME1719 se cultivaron en YPGaL (1% de extracto de bacto-levadura, 2% de bacto-peptona, 2% de galactosa, 1% de lactato) para un O.D. en 600 nm de 0,6. Se cosecharon 100 ml de cultivo por centrifugado, se lavó con 10 ml de agua, se recentrifugó y se resuspendió en 10 ml de una solución que contenía 1,2 M de sorbitol, 25 mM de Na<sub>2</sub>EDTA pH = 8,0 y 6,7 mg/ml de ditiotreitól. La suspensión se incubó a 30°C durante 15 minutos, se centrifugó y las células se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía 1,2 M de sorbitol, 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1 M de citrato sódico, pH 0 5,8, y 2 mg de NovozymC3234. La suspensión se incubó a 30°C durante 30 minutos, las células se recogieron por centrifugado, se lavaron en 10 ml de 1,2 M de sorbitol y 10 ml de CAS (1,2 M de sorbitol, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris HCl (Tris = Tris(hidroximetil)-aminometano) pH = 7,5) y se resuspendieron en 2 ml de CAS. Para la transformación, 1 ml de células suspendidas en CAS se mezclaron con aprox. 0,1 mg de ADN plásmido y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. 1 ml de (20% de polietilenglicol 4000, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris HCl, pH = 7,5) se añadió y se dejó la mezcla durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó y el granulado se resuspendió en 0,1 ml de SOS (1,2 M de sorbitol, 33% v/v de YPD, 6,7 mM de CaCl<sub>2</sub>) y se incubó a 30°C durante 2 horas. La suspensión se centrifugó después y el granulado se resuspendió en 0,5 ml de 1,2 M de sorbitol. Luego, se añadió 6 ml de agar superior (el medio SC de Sherman *et al.* (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory) que contenía 1,2 M de sorbitol más 2,5% de agar a 52°C y la suspensión se vertió sobre las placas que contenían el mismo sorbitol solidificado en agar que contenía el medio.

### Ejemplo 1

[0160] Construcción de un sistema de expresión de levadura para el precursor de insulina humana B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H).

[0161] La figura 1 muestra un plásmido de levadura llamado pESI42-33. El plásmido contiene un cassette de expresión que incluye un fragmento *EcoRI* - *XbaI* insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*. En el plásmido pESI42-33, el fragmento *EcoRI* - *XbaI* codifica un producto de fusión compuesto por el pre-pro líder MFα1\*, un sitio de escisión Lys-Arg para la endopeptidasa Kex2 de procesamiento dibásico y el precursor de insulina B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H).

[0162] Un fragmento de ADN que contiene secuencias que codifican el precursor de insulina B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H) se construyó usando oligonucleótidos sintéticos y amplificaciones de PCR estándar. El fragmento de PCR resultante se purificó, digirió con *NcoI* y *XbaI* y se ligó al fragmento de vector *NcoI* - *XbaI* del vector de expresión de tipo cPOT modificado (Figura 1).

[0163] El plásmido de expresión se propagó en *E. coli*, se cultivó en presencia de ampicilina y se aisló usando técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN plásmido se controló para inserto por nucleasas de restricción apropiadas (p. ej., *EcoRI*, *NcoI*, *XbaI*) y mostró por el análisis de secuencias que contenía la secuencia apropiada del precursor de insulina humana B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H).

[0164] El plásmido se transformó en la cepa MT663 de *S. cerevisiae*. Los transformantes de levadura que albergaban el plásmido se seleccionaron utilizando glucosa como fuente de carbono en placas de agar (2%) YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa).

### Ejemplo 2

[0165] Construcción de un sistema de expresión de levadura para los mutantes de activación de CPY.

[0166] La figura 2 muestra un plásmido de levadura llamado pPRC1. El plásmido contiene un cassette de expresión que incluye un fragmento *ClaI* - *NheI* insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*. En el plásmido pPRC1, el fragmento *ClaI*-*NheI* codifica pre-pro-CPY de tipo salvaje. Todos los plásmidos mutantes de CPY son idénticos a pPRC1s salvo las mutaciones puntuales pertinentes hechas para introducción de motivos de escisión de Kex2 dibásicos.

[0167] Los fragmentos de ADN que contienen secuencias que codifican *PRC1* mutado para inserción de sitios de escisión Kex2 se construyeron usando oligonucleótidos sintéticos, ADN de levadura genómico como modelo y amplificaciones de PCR estándar. Los fragmentos de PCR resultantes se purificaron, se digirieron con *ClaI* y *NheI* y se ligaron al fragmento de vector *ClaI*-*NheI* del vector de expresión de tipo cPOT modificado.

[0168] El plásmido de expresión se propagó en *E. coli*, se cultivó en presencia de ampicilina y se aisló usando técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN plásmido se comprobó para inserto por nucleasas de restricción apropiadas y mediante el análisis de secuencias mostró que contenía la secuencia apropiada del PRC1.

[0169] El plásmido se transformó en la cepa MT663 de *S. cerevisiae*. Los transformantes de levadura que albergaban el plásmido se seleccionaron utilizando glucosa como fuente de carbono en placas de agar (2%) YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa).

### Ejemplo 3

[0170] Construcción de un sistema de levadura para coexpresión del precursor de insulina B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H) y unos mutantes de activación de CPY.

5 [0171] La figura 3 muestra un plásmido de levadura llamado pSA160. El plásmido contiene un cassette de expresión que incluye un fragmento *EcoRI-XbaI* insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*. En el plásmido pSA160, el fragmento *EcoRI - XbaI* codifica un producto de fusión compuesto por el pre-pro líder MFα1\*, un sitio de escisión Lys-Arg para la endopeptidasa de procesamiento dibásico Kex2 y el precursor de insulina B(1-30)- LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H).  
10 El plásmido también contiene un cassette de expresión que codifica el mutante de CPY "F", que comprende un fragmento *KpnI - SacI* insertado en el plásmido entre después del promotor de transcripción del gen PRC1 de *S. cerevisiae*.

15 [0172] El cassette de insulina se subclonó en un vector de expresión de tipo cPOT adecuado. Posteriormente, el promotor *PRC1* se amplificó por PCR utilizando ADN de levadura genómico como modelo y se clonó en el plásmido anterior como un fragmento *SacI - KpnI*. Finalmente, el ADN que codifica el mutante de CPY más el terminador se amplificó usando PCR y se clonó en el plásmido.

20 [0173] El plásmido de expresión se propagó en *E. coli*, se cultivó en presencia de ampicilina y se aisló usando técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN plásmido se comprobó para inserto por nucleasas de restricción apropiadas y mediante análisis de secuencias mostró que contenía la secuencia apropiada del marco de lectura abierto *PRC1*.

25 [0174] El plásmido se transformó en la cepa MT663 de *S. cerevisiae*. Los transformantes de levadura que albergaban el plásmido se seleccionaron utilizando glucosa como fuente de carbono en placas de agar (2%) YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa).

#### Ejemplo 4

30 [0175] Se construyeron varios mutantes de CPY. Los plásmidos se transformaron en la levadura y se llevaron a cabo fermentaciones de lote a escala de laboratorio por cultivo en unos medios definidos durante 72 horas a 30°C. El caldo de fermentación se evaluó para actividad de CPY usando el sustrato sintético N-(3-[2-Furil]acrilolil)-Phe-Phe. Usando este sustrato, la actividad de CPY se puede seguir espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a 337nm. Mediante la correlación de la actividad con la actividad de una CPY estándar con concentración conocida, se puede estimar la concentración en el sobrenadante. Basado en estos ensayos, se estimó que los 9 mutantes están  
35 presentes en una concentración de 0-2,3 mg/L.

Mutante	Concentración de CPY activa (mg/L)
A	0,21
B	0,41
C	0,30
D	0,13
E	0,85
F	2,25
G	0,02

40 [0176] Para examinar el grado de procesamiento, los sobrenadantes de fermentación fueron sometidos a análisis de transferencia Western, evaluando con anticuerpos de CPY. La proporción entre CPY no procesada (proCPY) y CPY procesada se estimó a partir de la transferencia. Ésta mostró hasta 80 % de conversión en CPY madura en el mejor de los mutantes.

#### Ejemplo 5

45 [0177] El plásmido pSA160 para coexpresión del precursor de insulina humana (B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H) y el mutante de activación de CPY "F" se transformó en la levadura y se llevaron a cabo fermentaciones de lote a escala de laboratorio por cultivo en unos medios definidos a 30°C. El caldo de fermentación se analizó por LC-MS después de 24 horas de cultivo de especies de insulina. Esto mostró que >90% de las especies de insulina segregadas eran análogos de insulina humana A14E, B25H completamente procesados. La  
50 figura 4 demuestra la eliminación exitosa de la extensión LA del C-terminal de la cadena B de insulina por la CPY activa segregada.

#### Ejemplo 6

55 [0178] La fermentación continua de una cepa de levadura que alberga el plásmido de coexpresión descrito en el ejemplo 3 mostró que los niveles de CPY fueron demasiado altos, lo que llevó a procesamiento aberrante del precursor de

insulina humana. Para encontrar una proporción adecuada entre el precursor de insulina humana y la CPY activa, el nivel de expresión del mutante de CPY se moduló por sustitución del promotor PRC1 con promotores alternativos.

[0179] Las regiones promotoras de los genes de *CYC1*, *KEX2*, *MF(alfa)1* y *MPD1* se amplificaron por PCR y se clonaron en los sitios *Sall* - *KpnI* del plásmido de coexpresión descrito en ejemplo 3, dando como resultado un intercambio de la secuencia promotora *PRC1* por las secuencias promotoras alternativas *CYC1*, *KEX2*, *MF(alfa)1* y *MPD1*, respectivamente. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa MT663 de *S. cerevisiae*. Los transformantes de levadura que albergaban el plásmido se seleccionaron utilizando glucosa como fuente de carbono en placas de agar(2%) YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa).

**Ejemplo 7**

[0180] Se llevaron a cabo fermentaciones de lote a escala de laboratorio con las nuevas cepas de levadura que albergaban los plásmidos descritos en el ejemplo 6. Las cepas se cultivaron en medios definidos a 30°C. Después de 72 horas, la concentración de CPY activa en el caldo de fermentación se determinó por medición de la actividad usando un sustrato cromogénico, FA-Phe-Phe. Los resultados muestran un amplio rango de niveles de expresión.

Promotor	Concentración de CPY con respect al promotor <i>PRC1</i> (%)
<i>CYC1</i>	0,3
<i>KEX2</i>	0,9
<i>MF(alfa)1</i>	0,07
<i>MPD1</i>	4,3
<i>PRC1</i>	100

**Ejemplo 8**

[0181] Las fermentaciones continuas se realizaron con las cepas de levadura que albergaban los plásmidos de coexpresión para la coexpresión del precursor de insulina humana B(1-30)-LARRDLGKR (SEC ID N°: 9)-(A1-21), insulina humana (A14E, B25H) y unos mutantes de activación de CPY descritos en el ejemplo 6. El promotor *KEX2* dio niveles de expresión de CPY que dieron lugar a un porcentaje muy bajo de insulina humana A14, B25 procesada de forma aberrante.

Promotor	% de insulin correctamente procesada
<i>PRC1</i>	80
<i>KEX2</i>	95

Listado de secuencias

[0182]

<110> Novo Nordisk A/S Nørgaard, Per

<120> Método para preparar carboxipeptidasas activadas

<130> 7493.204-WO

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

ES 2 425 413 T3

Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
 1 5 10 15

Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Asn Lys  
 20 25 30

Ile Lys Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
 35 40

<210> 2

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
 1 5 10 15

Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Asn Lys  
 20 25 30

Ile Lys Arg Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
 35 40

10

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

15

<400> 3

Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
 1 5 10 15

Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Leu Gly  
 20 25 30

Lys Arg Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
 35 40

20

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 4

Leu Gly Lys Arg Glu Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp  
 1 5 10 15

Asp Phe Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val  
 20 25 30

25

Asn Lys Ile Lys Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
 35 40

ES 2 425 413 T3

<210> 5  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae

5  
<400> 5  
Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Arg Asp Trp Asp Phe  
1 5 10 15  
  
Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Asn Lys  
20 25 30  
  
Ile Lys Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
35 40

10  
<210> 6  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
<400> 6  
Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
1 5 10 15  
  
Val Lys Arg Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Asn Lys  
20 25 30  
  
Ile Lys Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
35 40

15  
<210> 7  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
20  
<400> 7  
Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
1 5 10 15  
  
Val Val Lys Leu Asp Lys Arg Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val  
20 25 30  
  
Asn Lys Ile Lys Asp Pro Lys Ile Leu Gly  
35 40

25  
<210> 8  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Saccharomyces cerevisiae  
  
<400> 8

ES 2 425 413 T3

Lys Pro Lys Phe Pro Glu Ala Ile Lys Thr Lys Lys Asp Trp Asp Phe  
1 5 10 15

Val Val Lys Asn Asp Ala Ile Glu Asn Tyr Gln Leu Arg Val Asn Lys  
20 25 30

Ile Lys Asp Pro Lys Arg Gly Gly Ile Leu Gly  
35 40

<210> 9

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido C

<400> 9

Leu Ala Arg Arg Asp Leu Gly Lys Arg

1 5

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para preparar una carboxipeptidasa activada en una célula fúngica, donde una secuencia de ADN que codifica una proforma modificada de la carboxipeptidasa, que incluye un sitio de escisión Kex2 insertado en una posición de 0 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa de tipo salvaje, se expresa bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proforma modificada de la carboxipeptidasa, a partir de lo cual la prosequencia se escinde en la célula para liberar la forma activa libre de la carboxipeptidasa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además un paso de aislamiento de la forma activa de la carboxipeptidasa de la célula fúngica.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la célula fúngica tiene un gen *PEP4* no funcional (el gen que codifica la proteinasa A).
4. Método según la reivindicación 1-3, donde la carboxipeptidasa es endógena de la célula fúngica huésped.
- 20 5. Método según la reivindicación 1, donde el sitio de escisión Kex2 se inserta en la prosequencia a una distancia de 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la forma de tipo salvaje de la carboxipeptidasa.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, donde el sitio de escisión Kex2 se inserta en la prosequencia a una distancia de 5-20, 5-15 o 5-10 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la forma de tipo salvaje de la carboxipeptidasa.
7. Método según la reivindicación 1, donde el sitio de escisión Kex2 se inserta en una posición de 2-20, 2-15 o 2-10 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal de la enzima de carboxipeptidasa de tipo salvaje.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la carboxipeptidasa es CPY.
9. Método para preparar insulina humana madura o un derivado análogo, dicho método comprende la coexpresión en una célula fúngica de:
- 35 i) una secuencia de ADN que codifica un precursor de insulina humana o un derivado análogo que comprende una extensión C-terminal de la cadena B y  
ii) un ADN que codifica una proforma de una carboxipeptidasa que incluye un sitio de escisión Kex2 insertado en una posición de 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos arriba del residuo de aminoácido N-terminal natural en la carboxipeptidasa de tipo salvaje,
- 40 por lo cual, la extensión C-terminal de la cadena B de la molécula del precursor de insulina humana se escinde en la célula fúngica mediante la carboxipeptidasa coexpresada y activada y, a partir de lo cual, la insulina humana madura o un derivado análogo se aísla del medio de cultivo.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, donde la molécula del precursor de insulina humana comprende la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, la cadena A de insulina humana o un derivado análogo y un péptido C que enlaza la cadena B y la cadena A entre sí, donde el péptido C comprende al menos un sitio de escisión Kex2 y la cadena B comprende una extensión C-terminal que facilita una escisión Kex2 más eficaz del péptido C en la célula fúngica.
- 50 11. Método según la reivindicación 9-10, donde la extensión C-terminal de la cadena B tiene hasta 4 residuos de aminoácidos.
12. Método según la reivindicación 11, donde la extensión C-terminal de la cadena B se selecciona del grupo que consiste en Leu-Ala, Phe-Leu, Leu-Gly, Leu-Leu, Leu-Met y Leu-Ile.
- 55 13. Método según la reivindicación 9-12, donde la proforma de la carboxipeptidasa se expresa bajo regulación de un promotor diferente de su propio promotor.
- 60 14. Método según la reivindicación 13, donde la carboxipeptidasa es la enzima CPY de la levadura y el promotor es el promotor Kex2.

Figura 1

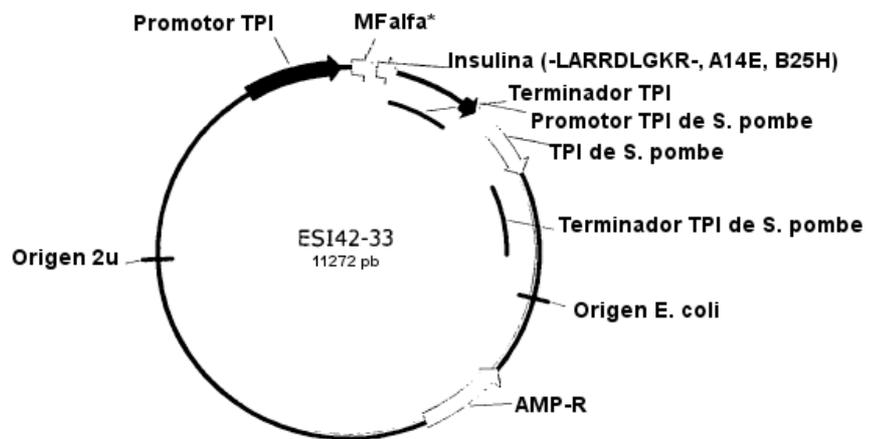


Figura 2

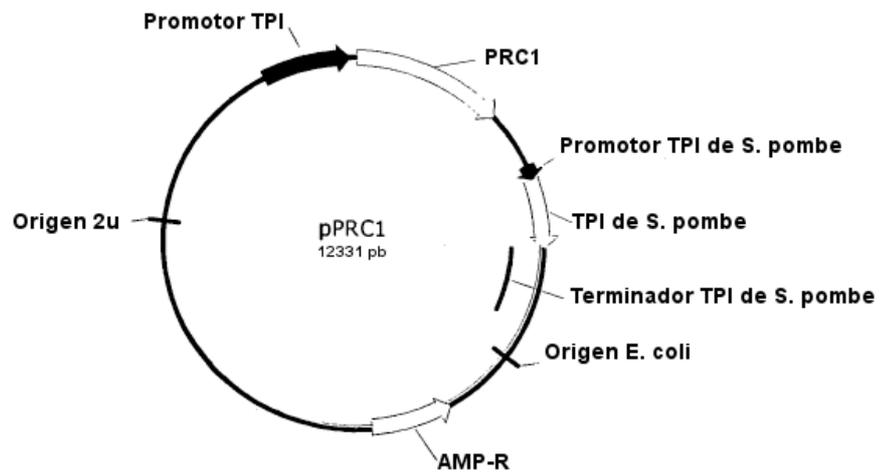


Figura 3

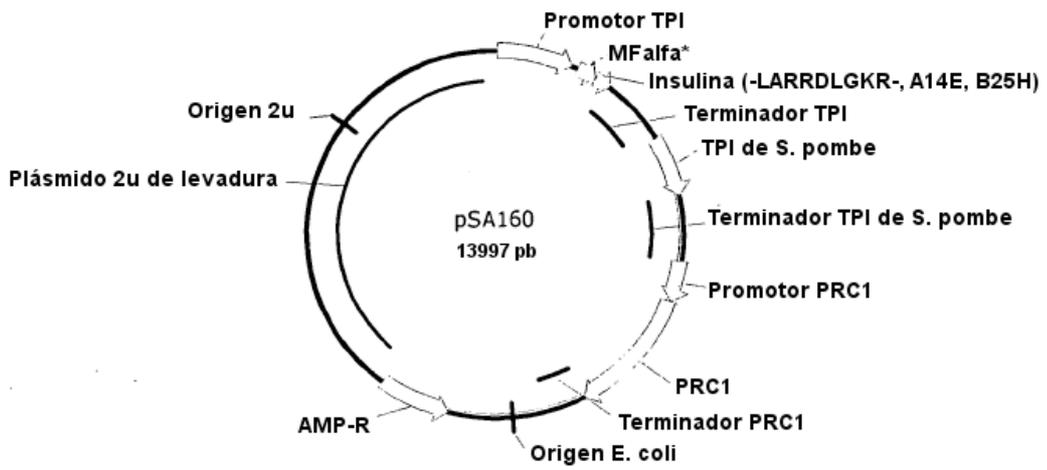


Figura 4

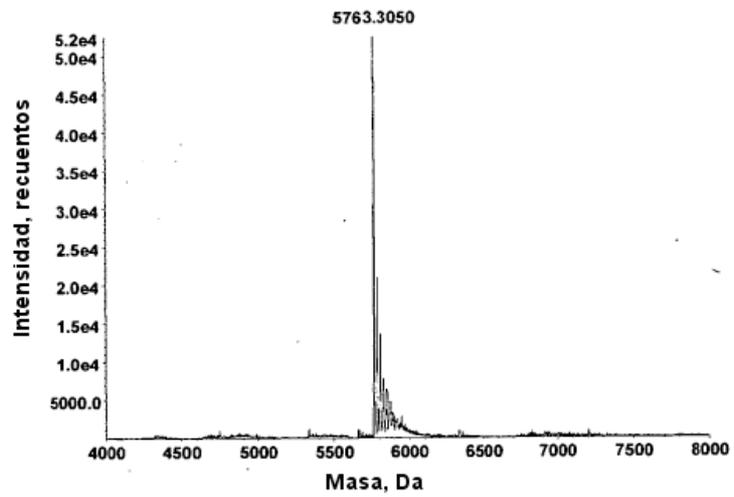


Figura 5

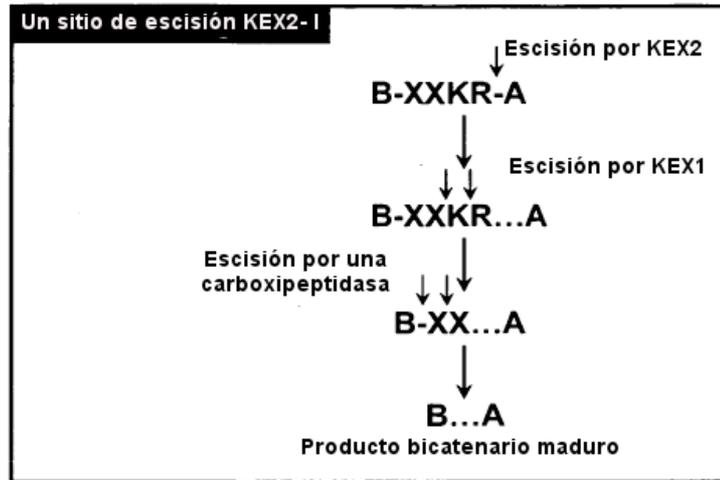


Figura 6

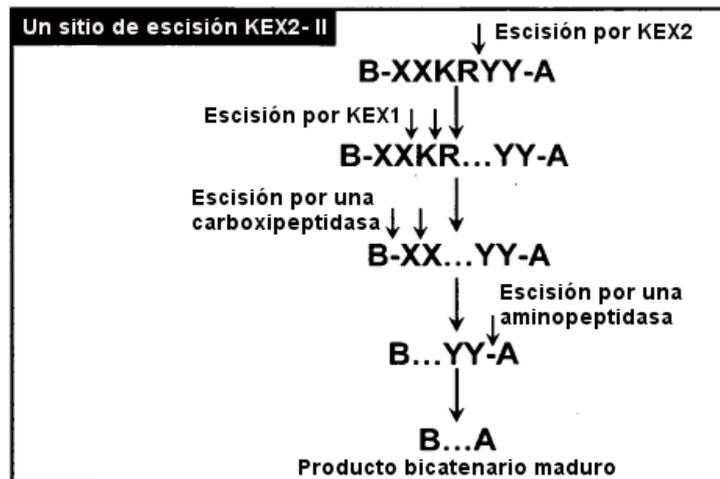


Figura 7

