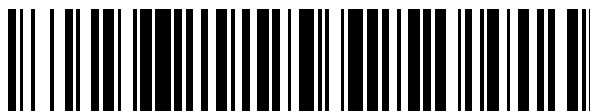


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 974**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2004** **E 04729047 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 1618135**

54 Título: **Corte de proteínas de fusión mediante la utilización de la proteasa granzima B**

30 Prioridad:

23.04.2003 DK 200300616
23.04.2003 US 464663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

LORENTSEN, RIKKE HOEGH y
FYNBO, CHARLOTTE HARKJAER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 427 974 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

Corte de proteínas de fusión mediante la utilización de la proteasa granzima B

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la preparación de un polipéptido de interés en forma auténtica mediante el corte enzimático de proteínas de fusión producidas recombinantemente mediante la utilización de la proteasa granzima B. Además, la invención se refiere a proteínas de fusión que comprende un sitio de corte de granzima B.

Antecedentes de la invención y técnica anterior

La producción y purificación de polipéptidos recombinantes tales como proteínas farmacéuticas en una forma altamente purificada y bien caracterizada se ha convertido en una tarea importante dentro del área de la ingeniería de proteínas en general y de la industria farmacéutica en particular.

La preparación de dichos polipéptidos recombinantes se basa frecuentemente en técnicas que implican la producción de los polipéptidos en forma de proteínas de fusión o de proteínas híbridas, en las que una proteína o polipéptido de interés se fusiona con un portador o con una pareja de fusión, tal como un polipéptido o una proteína.

La presencia de una pareja de fusión o portador que se encuentra fusionado con el polipéptido de interés presenta las ventajas de que puede causar que la proteína de fusión sea más resistente a la degradación proteolítica, puede facilitar una expresión y secreción incrementadas, mejorar la solubilidad y permitir la posterior purificación por afinidad de la proteína de fusión. También mediante expresión de proteínas de fusión pueden producirse materiales potencialmente peligrosos biológicamente, tales como hormonas peptídicas, en una forma inactiva que posteriormente puede activarse in vitro mediante escisión de la pareja de fusión.

Sin embargo, dichas proteínas de fusión normalmente no resultan adecuadas por sí mismas como productos finales debido a que la pareja de fusión, por ejemplo, puede afectar a la actividad biológica o a la estabilidad del polipéptido de interés y, en el caso de que la proteína esté destinada al uso clínico, puede provocar problemas de antigenicidad. Por lo tanto, resulta necesario cortar la proteína de fusión para liberar el polipéptido de interés.

En principio lo anterior puede conseguirse mediante métodos químicos o bioquímicos tales como el corte enzimático. Sin embargo, resulta importante que el corte sea altamente específico y sólo tenga lugar en una secuencia de corte entre el polipéptido de interés y la pareja de fusión, es decir, la región de unión, y preferentemente no dentro del polipéptido de interés mismo, ya que ello podría, por ejemplo, afectar gravemente la actividad biológica del polipéptido de interés. Dichos métodos utilizan agentes que actúan mediante hidrólisis de los enlaces peptídicos y la especificidad del agente de corte está determinada por la identidad del residuo aminoácido en el enlace peptídico que se corta o en un sitio próximo al mismo.

Los métodos bioquímicos de corte de las proteínas de fusión se basan en la utilización de proteasas (enzimas proteolíticos). Sin embargo, el corte enzimático de las proteínas de fusión se encuentra limitado en el aspecto de que el aminoácido o aminoácidos que son específicos del sitio de corte pueden hallarse también en el polipéptido de interés mismo. Por lo tanto, resultan particularmente adecuados los enzimas que, para cortar, no sólo reconocen un aminoácido sino una secuencia de aminoácidos, ya que la probabilidad de que una secuencia particular de aminoácidos se encuentre presente en una ocasión más en el polipéptido de interés además de en el sitio de corte entre el polipéptido de interés y la pareja de fusión es menor cuanto mayor sea el número de aminoácidos necesario para el reconocimiento y corte de la secuencia de corte.

Hasta hoy, se han utilizado varias proteasas para el corte enzimático de las proteínas de fusión mediante la puesta en contacto de la proteína de fusión con una proteasa bajo condiciones apropiadas.

El documento WO n° 03/010204 se refiere a un procedimiento para separar un polipéptido de interés de una proteína de fusión mediante la utilización de un enzima de corte ubiquitina, que según dicho documento es un enzima que corte un enlace peptídico situado contiguamente a la secuencia de aminoácidos RGG en el extremo C-terminal de proteínas tales como la ubiquitina.

La patente US n° 6.010.883 da a conocer un método en el que se utiliza el factor de coagulación sanguínea Xa (EC 3.4.21.6, una peptidasa de tipo serina formada a partir de factor proenzima X mediante proteólisis limitada) para la escisión de una pareja de fusión respecto de una proteína de fusión. Dicha proteasa corta específicamente después de la secuencia de aminoácidos X-Y-Gly-Arg, en la que X es Ile, Leu, Pro o Ala, e Y es Glu, Asp, Gln o Asn. El factor Xa preferentemente corta después de la secuencia de corte Ile-Glu-Gly-Arg.

Entre otros enzimas de la técnica anterior que se han propuesto y utilizado en métodos para el corte específico de proteínas de fusión se incluyen la proteinasa NIA del virus del grabado del tabaco, la colagenasa, la enteroquinasa, la subtilisina y la trombina.

Sin embargo, pueden producirse varios problemas al utilizar el corte proteolítico en los sistemas de proteínas de fusión. Un problema importante es que se produce el ataque proteolítico no específico de la proteína de fusión, lo que resulta en el corte en varios sitios y en consecuencia, en la pérdida de producto y en la generación de fragmentos contaminantes. Además, con los enzimas conocidos actualmente con frecuencia se producen problemas de corte ineficiente o incompleto de la proteína de fusión. Dicho corte ineficiente reduce el rendimiento y también puede introducir heterogeneidad en la proteína purificada, resultando en la recuperación de sólo una fracción reducida de la proteína deseada.

Un problema adicional que se asocia con varios de los enzimas utilizados actualmente para el corte de proteínas de fusión es que con frecuencia se unen aminoácidos espurios o extraños al producto polipéptido cortado (el polipéptido de interés). Estos aminoácidos típicamente se encuentran presentes al cortar un conector, y los residuos aminoácidos no relacionados pueden presentar un efecto sobre las propiedades del polipéptido de interés resultante. Lo anterior puede resultar crucial para proteínas producidas para terapéutica humana. Por lo tanto, es altamente deseable poder producir polipéptidos auténticos puros libres de secuencias cortas o residuos de aminoácidos extraños.

El problema de que queden aminoácidos extraños en el polipéptido de interés tras el corte queda ilustrado en la patente US nº 4.543.329, que describe un procedimiento para cortar selectivamente una proteína de fusión mediante la utilización de colagenasa. Sin embargo, la utilización de dicho enzima produce un polipéptido de interés con la secuencia extraña de aminoácidos Gly-Pro en su extremo N-terminal. Con el fin de obtener el polipéptido de interés en forma auténtica, estos aminoácidos extraños (Gly y Pro) deben eliminarse posteriormente en una etapa de reacción posterior mediante la utilización de una o más aminopeptidasas diferentes (tales como la aminoacilprolina aminopeptidasa y la prolina aminopeptidasa).

El problema también queda ilustrado en la patente US nº 5.427.927, que describe un procedimiento para el corte específico de secuencia de proteínas de fusión mediante la utilización de IgA proteasa, en la que se inserta un sitio de IgA proteasa en la región de unión de una proteína de fusión que es cortado posteriormente con IgA proteasa. El sitio de reconocimiento para la IgA proteasa es la secuencia de aminoácidos Y-Pro↓X-Pro, en la que X puede ser cualquier aminoácido, Y puede ser uno o varios aminoácidos arbitrarios, y ↓ se refiere al sitio de corte. Sin embargo, las proteínas de interés que se forman tras el corte con la IgA proteasa se caracterizan porque presentan una secuencia extraña de aminoácidos X-Pro en su extremo N-terminal, es decir, el polipéptido de interés resultante no se encuentra en su forma nativa o auténtica.

En la actualidad, los enzimas proteolíticos más ampliamente utilizados para el corte de proteínas de fusión son las serina proteasas factor Xa y trombina. Sin embargo, es conocido que ambos enzimas llevan a cabo un corte no específico de las proteínas de fusión. Además, el factor Xa ha sido aislado a partir de suero bovino y, en consecuencia, al utilizarlo para cortar proteínas para aplicaciones terapéuticas ha requerido una purificación y análisis extensivos posteriormente para detectar factores patogénicos tales como virus y priones, los cuales podrían encontrarse presentes (por ejemplo priones que causan la encefalopatía espongiforme bovina). Además, estos enzimas son bastante caros.

Por lo tanto, en vista de las desventajas e inconvenientes de la técnica anterior es un objetivo de la presente invención proporcionar un método mejorado para el corte enzimático de las proteínas de fusión.

Los presentes inventores han encontrado que los problemas técnicos anteriormente indicados pueden superarse mediante la utilización de proteasa granzima B (EC 3.4.21.79) para el corte enzimático de las proteínas de fusión. De esta manera, inesperadamente se ha encontrado que la proteasa granzima B permite un corte altamente eficiente de las proteínas de fusión que presentan un sitio de corte de proteasa granzima B con un elevado grado de especificidad de corte. En particular, la proteasa granzima B ha demostrado llevar a cabo un corte de las proteínas de fusión más específico que la proteasa actualmente utilizada ampliamente factor Xa. Además, se ha encontrado que el corte por granzima B de las proteínas de fusión que contienen una secuencia de reconocimiento de granzima B situado entre una pareja de fusión N-terminal y un polipéptido de fusión C-terminal, en el que el sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés, resulta en un polipéptido de interés que no presenta aminoácidos extraños derivados del sitio de corte, es decir, es un polipéptido en forma auténtica. De esta manera, pueden producirse proteínas recombinantes de interés con una secuencia de aminoácidos nativa como resultado del corte de las proteínas de fusión con granzima B. Además, la proteasa granzima B presenta la ventaja de que puede producirse recombinantemente.

Descripción resumida de la invención

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un método para la preparación de un polipéptido de interés en forma auténtica. El método comprende las etapas de: (i) proporcionar una proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, (a) una pareja de fusión, (b) un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte de proteasa granzima B, (c) un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés, e (ii) poner en contacto la proteína de fusión con la proteasa granzima B (EC 3.4.21.79) para cortarla en el sitio de corte, rindiendo el polipéptido de interés en forma auténtica.

En un aspecto adicional se proporciona una proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, (a) una pareja de fusión, (b) un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte de proteasa granzima B y (c) un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés.

En todavía otros aspectos se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos aislada codificante de dicha proteína de fusión, un vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada, una célula huésped transformada con dicho vector y un método para la producción de la proteína de fusión que comprende las etapas de: (i) proporcionar dicho vector recombinante que se encuentra operablemente ligado a un promotor, (ii) transformar una célula huésped con el vector recombinante, (iii) cultivar la célula huésped bajo condiciones en las que se expresa la proteína de fusión, e (iv) opcionalmente aislar la proteína de fusión.

Exposición detallada de la invención

En un aspecto la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido de interés en forma auténtica mediante corte enzimático de proteínas de fusión. De acuerdo con lo anterior, el método comprende, tal como se ha indicado anteriormente, una etapa de proporcionar una proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte de proteasa granzima B y un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte se encuentra situado contiguamente al polipéptido de interés. La proteína de fusión posteriormente se pone en contacto con proteasa granzima B para cortar la proteína de fusión en el sitio de corte de proteasa granzima B, rindiendo el polipéptido de interés en forma auténtica. La expresión "proteína de fusión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende dominios proteicos de por lo menos dos proteínas diferentes.

Según la presente invención se proporciona un método para producir polipéptidos de interés en forma auténtica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "forma auténtica" se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del mismo sin ningún residuo aminoácido adicional. Tal como se ha indicado anteriormente, un problema importante de varios de los enzimas utilizados actualmente para el corte de proteínas de fusión es que con frecuencia quedan unidos aminoácidos espurios o foráneos al producto polipéptido cortado, es decir, resulta un polipéptido que no se encuentra en una "forma auténtica". De esta manera, en el presente contexto el polipéptido de interés en forma auténtica se refiere a un polipéptido que presenta la misma secuencia de aminoácidos primaria que la codificada por la secuencia génica nativa codificante del polipéptido de interés, es decir, no contiene ningún aminoácido no nativo. La expresión "secuencia génica nativa" no es necesariamente una secuencia génica presente en la naturaleza, sino que también puede ser parcial o completamente artificial. De manera similar, se apreciará que un polipéptido de interés en forma auténtica no es necesariamente un polipéptido que se encuentra en la naturaleza, sino que también puede ser parcial o completamente artificial. En contraste, un polipéptido "no auténtico" contiene por lo menos un aminoácido que no se encuentra codificado por la secuencia génica nativa codificante del polipéptido de interés.

Según la invención, la región de unión entre el polipéptido de interés y la pareja de fusión comprende un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que presenta un sitio de corte de proteasa granzima B. Dicho sitio de reconocimiento se refiere a una secuencia de aminoácidos definida que permite que el granzima B reconozca y corte la región de unión entre la pareja de fusión y el polipéptido de interés. De esta manera, el sitio de corte debe entenderse como el sitio entre dos aminoácidos de una secuencia de aminoácidos en el que tiene lugar el corte de la proteína de fusión. La región de unión puede encontrarse en forma de una secuencia conectora de cualquier longitud adecuada que no sea parte del polipéptido de interés. Sin embargo, con el fin de obtener el polipéptido de interés en forma auténtica, el sitio de corte de granzima B se sitúa en posición contigua al extremo N-terminal del polipéptido de interés con el fin de permitir el corte específico de la proteína de fusión en su extremo N-terminal sin resultar en que queden unidos aminoácidos espurios o extraños al polipéptido de interés resultante. Por lo tanto, la expresión "contiguo a" implica que la secuencia de reconocimiento de granzima B, que en algunas realizaciones puede encontrarse precedida por una secuencia conectora o ser una parte de la misma, se sitúa de manera que el sitio de corte de granzima B flanquea el extremo N-terminal del polipéptido de interés.

Los granzimas son serina proteasas almacenadas en gránulos, que participan en las reacciones citotóxicas de defensa mediadas por células asesinas naturales tras el reconocimiento de las células diana. La función principal de los granzimas es inducir la muerte de las células infectadas por virus y otras células potencialmente dañinas. El granzima B es un tipo de granzima, y al producirse el contacto con la célula diana es exocitado direccionalmente, entrando en las células diana asistido por la perforina (una proteína citolítica expresada por las células T citotóxicas y por las células asesinas naturales). El granzima B procesa y activa diversas procaspasas, induciendo de esta manera la apoptosis en la célula diana. Según la invención, la expresión "proteasa granzima B" (también denominada en la presente memoria GrB) incluye enzimas que se clasifican, o pueden clasificarse, bajo la Comisión de enzimas (EC) n° 3.4.21.79 en la base de datos de nomenclatura de enzimas, versión 34, febrero de 2004 (<http://www.expasy.org/enzyme>). De esta manera, según la invención, puede utilizarse cualquier proteasa granzima B adecuada, incluyendo la proteasa granzima B humana, la proteasa granzima B de ratón y la proteasa granzima B de rata. Resulta generalmente preferente utilizar el granzima B humano, en el caso de que el método según la invención se utilice para la preparación de productos proteicos terapéuticos humanos. La proteasa granzima B humana se encuentra en la mayoría de tejidos humanos, en donde su función biológica es bien conocida. Por lo tanto, la presencia de cantidades traza de proteasa granzima B residual en el producto proteico terapéutico final muestra un riesgo mínimo para el paciente en el que se administre el producto proteico terapéutico. De esta manera, es conocido que al inyectar proteasa granzima B activa en el flujo sanguíneo humano, es atrapada rápidamente por la macroglobulina- $\alpha 2$ y que el complejo es eliminado a través del receptor recaptador LRP. La proteasa granzima B también es conocida bajo el nombre alternativo "proteínasa-2 de linfocitos T citotóxicos".

La proteasa granzima B es conocido que presenta una preferencia para el corte después de los residuos aspartato (D) y el granzima B es la única serina proteasa de mamífero que es conocido que presenta esta especificidad proteolítica para P1. Por lo tanto, según la invención se encuentra contemplado que el sitio de corte de granzima B en realizaciones útiles comprenda por lo menos un residuo aspartato en la posición P1 situada N-terminalmente respecto al sitio de corte. Algunos de los sitios de reconocimiento de proteasa granzima B actualmente conocidos se dan a conocer en Harris et al., 1998. De esta manera, en realizaciones útiles, el sitio de reconocimiento presenta una secuencia de aminoácidos de la fórmula general: P4 P3 P2 P1↓, situada N-terminalmente respecto al sitio de corte, en la que P4 preferentemente es el aminoácido I o V, P3 preferentemente es el aminoácido E, Q o M, P2 es X, en el que X se refiere a cualquier aminoácido, P1 preferentemente es el aminoácido D, y ↓ es el sitio de corte para la proteasa granzima B.

Los presentes inventores han encontrado que la proteasa granzima B es capaz de cortar los polipéptidos de interés a partir de una proteína de fusión, sin dejar ningún aminoácido no nativo en el polipéptido de interés. En particular, inesperadamente se ha encontrado que el granzima B reconocería y cortaría polipéptidos a partir de una proteína de fusión después de la posición P1 sin ningún requisito estricto respecto a residuos aminoácidos específicos en las posiciones P1'-P4', es decir, las posiciones de los aminoácidos situados después del sitio de corte. Esto se opone a los resultados de la técnica anterior. Por ejemplo, en Sun et al. 2001, se concluye que los residuos P1'-P4' de los sustratos del granzima B resultan importantes para la unión al sustrato y que la afinidad más alta para el sustrato se observa en el caso de que se encuentre presente un residuo P4' ácido (es decir, aspartato o ácido glutámico). Además, Harris et al., 1998, concluyeron que el granzima B presenta una fuerte preferencia por el residuo glicina presente en la posición P2'. A pesar de estos resultados de la técnica anterior, ahora se ha establecido que la proteasa granzima B puede utilizarse generalmente para cortar polipéptidos de interés a partir de proteínas de fusión sin necesidad de residuos aminoácidos específicos en las posiciones P1'-P4'.

Tal como se ha indicado anteriormente, una ventaja particular adicional de la presente invención es el resultado de que la proteasa granzima B permite un corte altamente eficiente de las proteínas de fusión que presentan un sitio de corte de proteasa granzima B situado N-terminalmente respecto al polipéptido de interés con un elevado grado de especificidad de corte. En particular se ha encontrado que la proteasa granzima B lleva a cabo un corte de las proteínas de fusión más específico que la proteasa actualmente utilizada ampliamente para el corte de proteínas de fusión, es decir factor Xa. De esta manera, tal como resultará evidente a partir de los ejemplos, posteriormente, se ha encontrado que el corte con proteasa granzima B de cinco proteínas de fusión diferentes previamente generadas como proteínas de fusión cortables con factor Xa, presentaba un rendimiento de corte que era tan específico o incluso más específico que el observado con el factor Xa. Lo anterior puede observarse, por ejemplo, en el Ejemplo 8 y en la figura 11 adjunta, que ilustra un análisis PAGE de curso temporal extendido de la digestión de las proteínas de fusión H6-IEGR-RAP y H6-IEPD-RAP con factor Xa y granzima B, respectivamente. Se observa claramente a partir de dicho experimento que, tras 30 minutos, se había producido un corte esencialmente completo de las proteínas de fusión con ambas proteasas. Sin embargo, se produjeron más productos de degradación al utilizar el factor Xa que con el granzima B. Ello demuestra claramente que el granzima B es altamente específico y todavía más específico que la proteasa ampliamente utilizada factor Xa. La elevada versatilidad y gran flexibilidad del granzima B queda corroborada adicionalmente en la presente memoria por los resultados de que el granzima B es capaz tanto de cortar etiquetas N-terminales relativamente cortas, tales como una cola hexa-His a partir de un polipéptido de interés, como de cortar entre una pareja de fusión y un polipéptido de interés muy estrechamente conectados mediante una secuencia conectora corta.

Aunque no resulta necesario, puede resultar ventajoso en determinadas realizaciones seleccionar el polipéptido de interés de manera que éste, en caso de formar parte de la proteína de fusión, comprenda N-terminalmente los aminoácidos P1' y P2, resultando en el sitio de reconocimiento general de granzima B de fórmula P4 P3 P2 P1↓P1'P2', en la que P1' es X, en donde X se refiere a cualquier aminoácido y P2' es G. Aunque la proteasa granzima B no presenta una selectividad de aminoácidos estricta para la posición P1', existe una preferencia general para los aminoácidos hidrofóbicos de gran tamaño en esta posición, entre ellos Trp (T), Leu (L), Phe (F) e Ile (I). De esta manera, en una realización útil, el aminoácido en la posición P1' se selecciona de entre T, L, F e I. En determinadas realizaciones puede resultar ventajoso no incluir Pro (P) en la posición P2'. Puede resultar ventajoso en un aspecto adicional de la invención que el polipéptido de interés se selecciona de manera que, al formar parte de la proteína de fusión, comprenda N-terminalmente un aminoácido ácido en la posición P4', tal como D o E.

En el presente contexto, las expresiones "aminoácido" y "residuos aminoácidos" se refieren a todos los L- α -aminoácidos naturales. Esta definición pretende incluir la norleucina, la ornitina y la homocisteína. Los aminoácidos se identifican mediante denominaciones de tres letras o de una sola letra:

Asp, D:	ácido aspártico	Ile, I:	isoleucina
Thr, T:	treonina	Leu, L:	leucina
Ser, S:	serina	Tyr, Y:	tirosina
Glu, E:	ácido glutámico	Phe, F:	fenilalanina
Pro, P:	prolina	His, H:	histidina
Gly, G:	glicina	Lys, K:	lisina
Ala, A:	alanina	Arg, R:	arginina
Cys, C:	cisteína	Trp, W:	triptófano
Val, V:	valina	Gln, Q:	glutamina
Met, M:	metionina	Asn, N:	asparagina
Nle, J:	norleucina	Orn, O:	ornitina
Hcy, U:	homocisteína	Xxx, X:	cualquier L- α -aminoácido.

En realizaciones útiles adicionales, el sitio de reconocimiento de proteasa granzima B presenta una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre ICPD↓, IEAD↓, IEPD↓, IETD↓, IQAD↓, ISAD↓, ISSD↓, ITPD↓, VAPD↓, VATD↓, VCTD↓, VDPD↓, VDSD↓, VEKD↓, VEQD↓, VGPD↓, VEID↓, VRPD↓, VTPD↓, LEED↓, LEID↓, LGND↓, LGPD↓, AQP↓, en donde ↓ es el sitio de corte para el granzima B. Estos sitios de reconocimiento y de corte han sido descritos anteriormente por Casciola-Rosen et al., 1999.

Según la invención, las expresiones "polipéptidos de interés" o "polipéptido deseado" se refieren al polipéptido cuya expresión se desea dentro de la proteína de fusión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" no indica necesariamente un límite del tamaño del polipéptido de interés deseado. De esta manera, dicho término debe interpretarse en su sentido más amplio y por lo tanto incluye péptidos de hasta 50 ó más aminoácidos, incluyendo oligopéptidos tales como dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos y hexapéptidos, polipéptidos y proteínas. El polipéptido de interés puede ser un producto intermediario o un producto final que puede utilizarse, por ejemplo, en el campo de la medicina, en la investigación, en la protección ambiental o en procedimientos o productos industriales. Tal como se ha indicado anteriormente, en la proteína de fusión el polipéptido de interés se encuentra unido o fusionado con otra proteína o dominio de proteína, la pareja de fusión, proporcionando, por ejemplo, una estabilidad incrementada del polipéptido de interés y una fácil purificación de la proteína de fusión. En realizaciones útiles, el polipéptido de interés es una proteína tal como una proteína secretada. Las proteínas secretadas presentan diversas aplicaciones industriales, incluyendo como farmacéuticos y en el diagnóstico. La mayoría de los fármacos proteínas actualmente disponibles, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, eritropoyetinas, factores estimuladores de colonias y otras citoquinas diversas, son proteínas secretadas. En realizaciones útiles, el polipéptido de interés es una hormona polipeptídica, tal como somatotrofina, glucagón, insulina o interferón, un fragmento de región variable de anticuerpo de cadena sencilla (scfv) o una apolipoproteína, tal como la apolipoproteína a-i (apoA-I), la apolipoproteína A-II o la apolipoproteína A-IV.

En un aspecto adicional de la invención, el polipéptido de interés es un enzima, tal como el granzima B. De esta manera, al proporcionar una proteína de fusión según la invención y seleccionar la proteasa granzima B como el polipéptido de interés, se proporciona una proteasa granzima B autoactivadora que ofrece la posibilidad de proporcionar pro-granzima B inactivo que posteriormente puede activarse, en principio mediante la adición de una

única molécula de proteasa granzima B activa. De esta manera, se proporciona progranzima B que no es dependiente de la adición de, por ejemplo, activador biológico externo para su activación. Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos siguientes, se ha encontrado que la autoactivación del granzima B progresa cuantitativamente hasta completarse y se ha encontrado que muestras autoactivadoras de proteasa granzima B sometidas a incubación adicional durante varios días conservan niveles de actividad estables y producen una cantidad mínima de productos de autólisis. Lo anterior demuestra claramente que la proteasa granzima B autoactivadora presenta la ventaja de ser altamente estable frente a la autólisis (canibalismo), tal como se muestra en el Ejemplo 5 y en la figura 3.

La pareja de fusión puede ser, según la invención, de cualquier tipo adecuado con la condición de que sea un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína, incluyendo un tetrapéptido, un pentapéptido y un hexapéptido. Puede seleccionarse de manera que cause que la proteína de fusión sea más resistente frente a la degradación proteolítica, facilite la expresión y secreción incrementadas de la proteína de fusión, mejore la solubilidad y permite la posterior purificación por afinidad de la proteína de fusión.

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender en realizaciones útiles una pareja de fusión que es una etiqueta de afinidad. Dicha etiqueta de afinidad puede ser, por ejemplo, un dominio de afinidad que permita la purificación de la proteína de fusión en una resina de afinidad. La etiqueta de afinidad también puede ser una etiqueta polihistidina, incluyendo una etiqueta hexa-his, una etiqueta poliarginina, una etiqueta FLAG, una etiqueta Strep, una etiqueta c-myc, una etiqueta S, un péptido de unión a calmodulina, un péptido de unión a celulosa, un dominio de unión a quitina, una etiqueta glutatión-S-transferasa o una proteína de unión a maltosa.

Tal como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse cualquier proteasa granzima B adecuada según la invención, incluyendo la proteasa granzima B humana, la proteasa granzima B de ratón y la proteasa granzima B de rata. Sin embargo, tal como resultará evidente a partir de los Ejemplos siguientes, se ha encontrado que mediante la sustitución del residuo cisteína nº 228 (numeración de quimotripsinógeno) por fenilalanina en la proteasa granzima B humana, se proporciona una variante de proteasa granzima B humana que resultan en un rendimiento de proteína final más alto al producir granzima B humana, incluso sin afectar a la especificidad o actividad de corte del granzima B resultante en cualquier grado detectable. Este resultado es contrario a lo que se esperaría, ya que el aminoácido fenilalanina (aminoácido aromático) es químicamente muy diferente de la cisteína (aminoácido hidrofílico) y por lo tanto normalmente no sería la elección para una sustitución de la cisteína. De esta manera, en una realización actualmente preferente, la proteasa granzima B según la invención es una variante de proteasa granzima B humana en la que el residuo cisteína nº 228 (numeración de quimotripsinógeno) se muta en fenilalanina. Se apreciará que la expresión "variante de proteasa granzima B humana" también incluye variantes que, además de la mutación del residuo cisteína nº 228 (numeración de quimotripsinógeno), presentan variaciones adicionales de la secuencia de longitud completa de la proteasa granzima B humana nativa o en diversos dominios, por ejemplo variantes de proteasa granzima B en las que se añaden, o delecionan, uno o más residuos aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos de granzima B nativo de longitud completa. Dichas variaciones adicionales pueden realizarse, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservadoras y no conservadoras conocidas de la técnica. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones codificantes de la proteasa granzima B humana que resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteasa granzima B humana en comparación con la secuencia nativa de la proteasa granzima B humana, preferentemente sin afectar adversamente a la especificidad y/o actividad de la proteasa granzima B humana. La expresión "variante de proteasa granzima B humana" también incluye fragmentos de la secuencia de aminoácidos de granzima B nativa de longitud completa, tal como la forma activada, que presenta una mutación del residuo cisteína nº 228. En una realización útil, la variante de proteasa granzima B es la variante mostrada en SEC ID nº 57.

En general, la pareja de fusión típicamente se selecciona basándose en características que contribuyen al fácil aislamiento, siendo más deseables aquellos que son fácilmente secretados por microorganismos que producen la proteína de fusión. Las secuencias polihistidina, la glutatión-S-transferasa y la proteína de unión a maltosa, por ejemplo, resultan generalmente preferentes, ya que existe fácil disponibilidad de las columnas de afinidad a las que pueden unirse y de las que pueden eluirse.

El método según la invención puede incluir en realizaciones útiles una posterior etapa de aislamiento para aislar el polipéptido de interés que se forma mediante el corte enzimático de la proteína de fusión. Esta etapa de aislamiento puede llevarse a cabo mediante cualquier medio adecuado conocido de la técnica para el aislamiento de proteínas, incluyendo la utilización de intercambio iónico, el fraccionamiento por tamaño y la purificación por afinidad, dependiendo la elección del medio del carácter del polipéptido de interés. De esta manera, el polipéptido de interés puede, para el fin de la purificación por afinidad, por ejemplo, comprender además una etiqueta de afinidad unida C-terminalmente con el fin de permitir el aislamiento del polipéptido de interés resultante utilizando, por ejemplo, los sistemas de etiquetas de afinidad anteriormente indicados.

Según la invención, la proteína de fusión se pone en contacto con proteasa granzima B para cortar la proteína de fusión en el sitio de corte de proteasa granzima B en posición contigua al polipéptido de interés, rindiendo el polipéptido de interés en forma auténtica. Esta reacción puede llevarse a cabo por lotes utilizando granzima B libre, o puede llevarse a cabo mediante la utilización de proteasa granzima B en una forma inmovilizada, por ejemplo mediante adsorción, unión covalente, atrapamiento o confinado en membranas. Entre los portadores adecuados para proteasa granzima B inmovilizada se incluyen portadores convencionales tales como poliacrilamida, quitina, dextrano, carragenano kappa, celita y celulosa. La inmovilización de enzima mediante su acoplamiento covalente a matrices insolubles es una técnica utilizada extensamente. Se ha encontrado que los residuos lisina son los grupos más generalmente útiles para la unión covalente de enzimas a soportes insolubles debido a su exposición superficial extensa y elevada reactividad. De esta manera, en realizaciones útiles la proteasa granzima B se inmoviliza mediante un residuo aminoácido lisina. En un aspecto adicional, la proteasa granzima B se inmoviliza mediante su extremo C-terminal, por ejemplo mediante una etiqueta polihistidina, incluyendo una etiqueta hexahistidina. La reacción también puede llevarse a cabo mediante la utilización de una proteasa granzima B libre en combinación con un reactor biológico de tipo membrana, o utilizando un reactor biológico de tipo continuo conjuntamente con una proteasa granzima B inmovilizada.

Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos siguientes, inesperadamente se ha encontrado que el tiempo requerido para el corte de las proteínas de fusión libres (es decir, no inmovilizadas), que comprende una pareja de fusión polihistidina, tal como hexahistidina, puede reducirse drásticamente en el caso de que la proteína de fusión se ponga en contacto con proteasa granzima B en presencia de iones Ni^{2+} y ácido nitriloacético (NTA). Se encuentra contemplado que el motivo principal para este incremento notable de la velocidad de corte sea que los iones Ni^{2+} se unen a la pareja de fusión polihistidina N-terminal de la proteína de fusión y facilitan el acceso de la proteasa granzima B al sitio de corte. Además, también se ha considerado que la adición de NTA protegerá los iones Ni^{2+} en solución de manera similar a los iones sobre una columna de agarosa-NTA- Ni^{2+} , evitando de esta manera la precipitación de tanto la proteína de fusión como la proteína resultante. Al llevar a cabo dicho procedimiento de corte, resulta generalmente preferente que la concentración de Ni^{2+} se encuentre comprendida en el intervalo de entre 1 y 20 mM, y que la concentración de NTA se encuentre comprendida en el intervalo de entre 1 y 20 mM. Además, la temperatura preferentemente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 15°C y 50°C, incluyendo el intervalo de entre 20°C y 45°C. En una realización preferente, la temperatura se encuentra comprendida en el intervalo de entre 20°C y 30°C, tal como aproximadamente 23°C. En otra realización ligeramente menos preferente, la temperatura se encuentra comprendida en el intervalo de entre 30°C y 45°C, tal como aproximadamente 37°C. El intervalo de temperaturas óptimo, sin embargo, debe determinarse para cada proteína de fusión, ya que depende en parte de la estabilidad de la proteína de fusión a las diferentes temperaturas.

Según la invención, también se proporciona, tal como ya se ha indicado anteriormente, una proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, (a) una pareja de fusión, (b) un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte de proteasa granzima B y (c) un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés. En realizaciones útiles, el polipéptido de interés es granzima B, que de esta manera proporciona una proteasa granzima B autoactivadora. En particular se proporcionan proteínas de fusión pro-granzima B humanas autoactivadoras que comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, una prosecuencia de siete residuos aminoácidos que presenta un sitio de reconocimiento de granzima B y un sitio de corte seguido de la secuencia de aminoácidos para el granzima B humano activado y finalmente una etiqueta hexa-histidina (H6) fusionada con el extremo C-terminal del granzima B. De esta manera, el sitio de corte de granzima B se encuentra situado contiguamente a Il16 (numeración de quimotripsinógeno) de la secuencia de aminoácidos del granzima B activado. Más en particular, se proporcionan las proteínas de fusión de granzima B autoactivadoras humanas pro-IEPD-GrB-H6 (SEC ID n° 2) y pro-IEAD-GrB-H6 (SEC ID n° 3). Tal como también se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que resulta ventajoso sustituir el residuo cisteína n° 228 (numeración de quimotripsinógeno) por alanina (A), treonina (T), valina (V) o fenilalanina (F) mediante mutación sitio-dirigida. De esta manera, en realizaciones útiles adicionales se proporcionan proteínas de fusión autoactivadoras seleccionadas de entre el grupo que consiste de pro-IEPD-GrB-H6 C228A (SEC ID n° 5), pro-IEPD-GrB-H6 C228T (SEC ID n° 6), pro-IEPD-GrB-H6 C228V (SEC ID n° 7) y pro-IEPD-GrB-H6 C228F (SEC ID n° 8).

La proteína de fusión o la variante de proteasa granzima B de la presente invención puede expresarse en cualquier sistema de expresión de proteínas estándar adecuado mediante el cultivo de un huésped transformado con un vector codificante de la proteína de fusión bajo condiciones que permiten que se exprese dicha proteína de fusión. Preferentemente, el sistema de expresión es un sistema a partir del que la proteína de fusión deseada puede aislarse y plegarse nuevamente in vitro fácilmente. A modo de principio general, los sistemas de expresión procarióticos resultan preferentes ya que pueden obtenerse rendimientos de proteínas elevados y se dispone de estrategias de purificación y re-plegamiento eficientes. Sin embargo, pueden seleccionarse numerosas células huésped según resulte apropiado para la transformación y expresión de la proteína de fusión indicada, incluyendo células huésped de mamífero, de insecto, fúngicas y bacterianas, las cuales resultan particularmente deseables. Entre las cepas bacterianas utilizadas habitualmente se incluyen *Bacillus* y *Escherichia*, incluyendo *E. coli*. De esta manera, se encuentra perfectamente comprendido dentro de las capacidades y discreción de juicio del experto en la

materia, sin necesidad de experimentación indebida, seleccionar un huésped y sistema de expresión favoritos o apropiados. De manera similar, tras seleccionar la secuencia primaria de aminoácidos para la proteína de fusión de la presente invención, el experto ordinario en la materia podrá diseñar fácilmente una secuencia de ácidos nucleicos recombinante o constructos de ADN apropiados codificantes de las proteínas de fusión o la variante de proteasa granzima B de la invención, considerando factores tales como los sesgos de codones en el huésped seleccionado, la necesidad de secuencias de señal de secreción en el huésped, la introducción de sitios de corte de proteinasa dentro de la secuencia de señal, y similares. Estos constructos de ADN recombinante pueden insertarse en el mismo marco de lectura en cualquiera de varios vectores de expresión apropiados para el huésped seleccionado. La elección de un vector de expresión apropiado o favorito es una cuestión, nuevamente, perfectamente comprendida dentro de las capacidades y discreción de juicio del experto en la materia. Preferentemente, el vector de expresión incluirá un promotor fuerte para controlar la expresión de los constructos recombinantes.

Finalmente, se proporciona un método para la producción de una proteína de fusión según la invención que comprende las etapas de: (i) proporcionar un vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada codificante de la proteína de fusión de la invención que se encuentra operablemente ligada a un promotor, (ii) transformar una célula huésped con dicho vector recombinante, (iii) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión, y (iv) aislar opcionalmente la proteína de fusión.

A continuación se describirá la invención a título ilustrativo en los ejemplos no limitativos y figuras siguientes.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la actividad de una incubación de GrB-H6 con FX_a seguida durante varios días utilizando el ensayo colorimétrico siguiente: 500 ml de tampón (NaCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), 4 ml de Ac-IEPD-pNA 100 mM y 5 ml de GrBH6. Una mezcla de 100 ml de GrB-H6 (aproximadamente 10 mg) con 1 ml de FX_a (1 mg/ml) se mantuvo a 4°C durante la incubación y se midió la actividad tras 0 horas, 2 horas, 5 horas, 19 horas, 2 días y 5 días.

La figura 2 muestra la actividad tanto de GrB-H6 como de GrB-H6 C228F hacia varios sustratos cromogénicos: Ac-IEPD-pNA, Ac-LEED-pNA, Ac-VEID-pNA, Ac-YVAD-pNA y Ac-DEVD-pNA. Se llevó a cabo el ensayo de actividad en 500 ml de HEPES 100 mM, pH 7,75 con una concentración de sustrato de 400 mM y se añadió 1 mg de proteasa para cada medición. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 23°C y por triplicado y las actividades obtenidas se normalizaron fijando la actividad medida de Ac-IEPD-pNA en 100%.

La figura 3, panel (A) muestra la SDS-PAGE de muestras procedentes de la incubación de GrB-H6 C228F en HEPES 100 mM, pH 7,4 a 4°C, a 23°C y a 37°C.

Descripción de los carriles A-N:

- A: Marcador de peso molecular
- B: GrB-H6 C228F, antes de la incubación
- C: GrB-H6 C228F incubado a 4°C durante 1 día
- D: GrB-H6 C228F incubado a 4°C durante 3 días
- E: GrB-H6 C228F incubado a 4°C durante 6 días
- F: GrB-H6 C228F incubado a 4°C durante 15 días
- G: GrB-H6 C228F incubado a 23°C durante 1 día
- H: GrB-H6 C228F incubado a 23°C durante 3 días
- I: GrB-H6 C228F incubado a 23°C durante 6 días
- J: GrB-H6 C228F incubado a 23°C durante 15 días
- K: GrB-H6 C228F incubado a 37°C durante 1 día
- L: GrB-H6 C228F incubado a 37°C durante 3 días
- M: GrB-H6 C228F incubado a 37°C durante 6 días
- N: GrB-H6 C228F incubado a 37°C durante 15 días

El carril B muestra GrB-H6 C228F intacto. Esta banda de proteasa intacta puede observarse en todos los carriles (1). En los carriles I-N aparece otra banda (2), que debe ser un producto de degradación de la proteasa, posiblemente surgida por autocorte entre Asp50 y Phe51 en la secuencia IQDD↓FV.

La figura 3, panel (B) muestra la actividad de las muestras de GrB-H6 C228F incubadas en HEPES 100 mM, pH 7,4, a 4°C, a 23°C y a 37°C, medida tras 0, 6, (10) y 15 días. Se midió la actividad en 500 ml de HEPES 100 mM, pH 7,4 y Ac-IEPD-pNa 400 mM con 0,2 mg de GrB-H6 C228F a partir de las incubaciones añadidas para cada medición.

La figura 4 muestra la SDS-PAGE de muestras de las incubaciones de H6-TripUB IEPD↓SP y H6-IEPD-TN123 tras 12 horas de incubación con GrB-H6.

Descripción de los carriles A-J:

- A: Marcador de peso molecular
 B: H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP solo, tras 12 horas de incubación
 C: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 1 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 5 D: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 10 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 E: H6-FX-TripUB incubado con FX_a
 F: H6-IEPD-TN123 solo, tras 12 horas de incubación
 G: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 H: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 10 I: GrB-H6 solo a la misma concentración que en los carriles D y H
 J: H6-FX-TN123 murino incubado con FX_a

El carril B muestra H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP (1) no cortado, en el que no se añadió GrB-H6, mientras que los carriles C y D muestran las dos incubaciones con adición de 1 y 10 μ l de GrB-H6. En ambos carriles indicados se observa el producto de la reacción de corte, H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP (2) correctamente cortado, además de la proteína de fusión no cortada. En el carril E, el constructo H6-FX-TripUB, que contiene el sitio de reconocimiento de FX_a, IQGR, en lugar del sitio de reconocimiento de GrB, IEPD, es cortado por FX_a, proporcionando un producto del mismo tamaño que H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP cortado por GrB-H6.

Los carriles F-J muestran las incubaciones de GrB-H6 + H6-IEPD-TN123 tras 12 horas. En el carril F se muestra H6 IEPD-TN123 (3) no cortado. Los carriles G y H muestran cómo H6-IEPD-TN123 es cortado por GrB-H6 en caso de no encontrarse presente Ca²⁺ (4). El patrón de bandas se explica en la figura 12. En el carril J, el constructo H6-FX-TN123 murino ha sido cortado por FX_a, mostrando el tamaño del producto correctamente cortado.

En la figura se marca con (5) la posición de GrB-H6 a la misma concentración que en las muestras, con adición de 10 μ l de GrB-H6.

La figura 5 muestra la SDS-PAGE de las muestras de las incubaciones de GrB-H6 + H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP tras 12, 19 y 24 horas de incubación, así como las muestras de las incubaciones de GrB-H6 + H6-IEPD-TN123. Descripción de los carriles A-K:

- A: Marcador de peso molecular
 B: H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP solo, tras 12 horas de incubación
 C: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 1 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 D: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 1 μ l de GrB-H6 tras 19 horas de incubación
 E: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 1 μ l de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
 35 F: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 10 μ l de GrB-H6 tras 19 horas de incubación
 G: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 10 μ l de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
 H: GrB-H6 solo, diluido tal como en F y G
 I: H6-IEPD-TN123 solo, tras 12 horas de incubación
 J: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
 40 K: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 tras 12 horas de incubación

El carril B muestra H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP no cortado (1). En los carriles C-E aparece en todos los carriles el producto correctamente cortado, marcado con (2) en la figura. A más adición de GrB-H6 y mayor tiempo de incubación, más producto de corte aparece en los carriles.

Los carriles I, J y K en la figura 3 son idénticos a los carriles F, G y H en la figura 2 con las incubaciones de H6-IEPD-TN123 + GrB-H6, aunque se ha hecho migrar una muestra más grande en el gel de la figura 3. Por lo tanto, las bandas son mucho más claras que en la figura 2. La banda marcada con (3) es H6-IEPD-TN123 no cortado y el patrón de bandas marcado con (4), (5), (6) y (7) se explica en la figura 12.

La figura 6 explica el patrón de bandas sencillo que se observa en las figuras 2 y 3. Sin adición de GrB-H6, no se produce corte y sólo se observa en el gel la banda de la proteína de fusión no cortada. En caso de que no se añada GrB-H6, se escinde la pequeña secuencia N-terminal y aparece el producto correctamente cortado en el gel además de la proteína de fusión no cortada que queda. La pequeña secuencia N-terminal escindida por GrB-H6 es excesivamente pequeña para visualizarse en el gel de SDS.

Las figuras 7, 8 y 9 muestran la SDS-PAGE de las muestras de las incubaciones de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + GrB-H6 a 23°C (figura 5), a 37°C (figura 6) y a 42°C (figura 7) sin adición (1), adición de Ni²⁺ 4,2 mM (2) y adición de Ni²⁺ 4,2 mM + NTA 5 mM (3).

Descripción de los carriles A-K (la misma para todas las temperaturas):

- A: Marcador de peso molecular
 B: H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP no cortado
 C: 200 μ l de H6-TripUB IEPD $\downarrow$ SP + 5 μ l de GrB-H6, sin adición

D: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, sin adición
 E: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, sin adición
 F: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM
 G: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM
 5 H: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM
 I: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM y NTA 5 mM
 J: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM y NTA 5 mM
 K: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6, Ni²⁺ 4,2 mM y NTA 5 mM

10 En los carriles C-E (1) en las tres figuras en las que no se añadió Ni²⁺ ni NTA, la proteína de fusión H6-TripUB IEPD↓SP es cortada a velocidades diferentes a las diferentes temperaturas. Tras 22 horas a 23°C se había cortado aproximadamente 40% de la proteína de fusión. A 37°C y a 42°C se había cortado más tras 22 horas que a 23°C, aproximadamente 60% a 37°C y 50% a 42°C.

15 Debido a la precipitación de la proteína observada a 37°C y a 42°C con Ni²⁺ 4,2 mM, no se observó en el gel más corte de la proteína de fusión tras 2 horas de incubación. Por lo tanto, se observó menos proteína en los carriles F-H (2) en las figuras 6 (37°C) y 7 (42°C) que en los carriles F-H (2) en la figura 5 (23°C). En la figura 5, carriles F-H (2), aproximadamente 50% de la proteína de fusión fue cortada en producto tras 22 horas de incubación, lo que es más que lo cortado sin adición de Ni²⁺.

20 No se observó precipitación con Ni²⁺ 4,2 mM + NTA 5 mM añadido a las incubaciones. En la figura 5, carriles I-K (3) se observa más producto que en los carriles C-E (1) y F-H (2), de manera que tras 22 horas de incubación a 23°C en presencia de tanto Ni²⁺ como NTA, aproximadamente 60% de la proteína de fusión había sido cortada, en comparación con sólo aproximadamente 40% sin adición y 50% con únicamente Ni²⁺.

25 Mediante el incremento adicional de la temperatura a 37°C (figura 6, carriles I-K (3)) y a 42°C (figura 7, carriles I-K (3)) se observa un incremento adicional de la tasa de corte. Tras 22 horas de incubación a 37°C prácticamente la totalidad de la proteína de fusión ha sido cortada formando el producto correcto. Se corta un poco menos a 42°C tras 22 horas.

La figura 10 muestra la SDS-PAGE de las muestras con las incubaciones de H6-IEPD-RAP con 1 ó 10 µl de GrB-H6. Descripción de los carriles (A-L):

30 A: Marcador de peso molecular
 B: H6-IEPD-RAP solo, tras 5 horas de incubación
 C: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de GrB-H6 tras 5 horas de incubación
 D: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 10 µl de GrB-H6 tras 5 horas de incubación
 35 E: H6-IEPD-RAP solo, tras 23 horas de incubación
 F: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de GrB-H6 tras 23 horas de incubación
 G: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 10 µl de GrB-H6 tras 23 horas de incubación
 H: H6-IEGR-RAP cortado parcialmente con FX_a, purificado
 I: H6-IEGR-RAP cortado parcialmente con FX_a, purificado
 40 J: H6-IEPD-RAP solo, tras 26 horas de incubación
 K: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de GrB-H6 tras 26 horas de incubación
 L: 200 µl de H6-IEPD-RAP + 10 µl de GrB-H6 tras 26 horas de incubación

45 Se muestra H6-IEPD-RAP no cortado (1) en los carriles B, E y J. En los carriles C y D resulta evidente que se ha cortado la totalidad de H6-IEPD-RAP, proporcionando el producto final (2) tras sólo 5 horas de incubación con 1 ó 10 µl de GrB-H6 tal como se ha indicado anteriormente. También resulta evidente que existe por lo menos un sitio interno de corte en RAP que da lugar a las dos bandas inferiores que aparecen en estos carriles, es decir, el producto final se corta en dos trozos, siendo ambos visibles en el gel (3). Los carriles F y G, y los carriles K y L, muestran esencialmente lo mismo que los carriles C y D, aunque las muestras se obtuvieron posteriormente, tras 23 y 26 horas de incubación con GrB-H6, dando lugar a más corte en el sitio interno aparente en RAP.

50 En los carriles H e I se muestran muestras purificadas de H6-IEGR-RAP cortado parcialmente (carril H) o completamente (carril I) por FX_a, proporcionando el producto RAP final. En estos carriles, los productos de degradación de cualquier corte interior por FX_a han sido eliminados mediante purificación.

55 La figura 11 muestra la SDS-PAGE de las muestras de las incubaciones de H6-IEPD-RAP + GrB-H6 y de H6-IEGR-RAP + FX_a. Descripción de los carriles (A-O):

A: Marcador de peso molecular
 B: H6-IEGR-RAP solo, tras 27 horas de incubación
 60 C: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 1/2 hora de incubación
 D: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 1 hora de incubación
 E: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 3 horas de incubación
 F: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 5 horas de incubación

G: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 7 horas de incubación
H: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 1 µl de FX_a tras 27 horas de incubación
I: H6-IEPD-RAP solo, tras 27 horas de incubación
J: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 1/2 hora de incubación
K: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 1 hora de incubación
L: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 3 horas de incubación
M: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 5 horas de incubación
N: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 7 horas de incubación
O: 400 µl de H6-IEPD-RAP + 2 µl de GrB-H6 tras 27 horas de incubación

En los carriles B-H se encuentran las muestras de la incubación de H6-IEGR-RAP (1), en la que el carril B muestra H6-IEGR-RAP no cortado. Los carriles C-H muestran que tras sólo 1/2 hora, prácticamente la totalidad de la proteína de fusión había sido cortada por FX_a, proporcionando el producto correcto. En los carriles D-G aparecen algunos productos de degradación, y en el carril H tras 27 horas de incubación, la totalidad de la proteína de fusión se ha degradado, proporcionando una diversidad de trozos más pequeños y no queda producto correctamente cortado. Los carriles I-O muestran las muestras de la incubación de H6-IEPD-RAP (2). El carril I muestra H6-IEPD-RAP no cortado, y respecto a H6-IEGR-RAP, prácticamente la totalidad de H6-IEPD-RAP ha sido cortado correctamente tras sólo 1/2 hora de incubación con GrB-H6, tal como se observa en el carril J. En los carriles K-N, aparecen productos de degradación, aunque ni mucho menos tantos como en la incubación de H6-IEGR-RAP. En el carril O, tras 27 horas de incubación todavía queda bastante producto correctamente cortado.

La figura 12 muestra la SDS-PAGE de las muestras de las incubaciones de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + GrB-H6 C228F y de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + FX_a. Descripción de los carriles (AM):

A: Marcador de peso molecular
B: H6Ubi-IEPD-ApoA1 solo, tras 0 horas de incubación
C: 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F, 1 hora de incubación
D: 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F, 3 hora de incubación
E: 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F, 6 horas de incubación
F: 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F, 24 horas de incubación
G: 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F, 48 horas de incubación
H: H6Ubi-IEGR-ApoA1 solo, tras 0 horas de incubación
I: 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a, 1 horas de incubación
J: 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a, 3 horas de incubación
K: 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a, 6 horas de incubación
L: 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a, 24 horas de incubación
M: 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a, 48 horas de incubación

En los carriles B-G se encuentran las muestras de la incubación de H6-IEPD-ApoA1 (1), en la que el carril B muestra la preparación de H6Ubi-IEPD-ApoA1 no cortada. Los carriles H-M muestran las muestras de la incubación de H6Ubi-IEGR-ApoA1 (2), en la que el carril H muestra la preparación de H6Ubi-IEGR-ApoA1 no cortada. La posición de las proteínas de fusión no cortadas intactas está indicada con (3). Las bandas marcadas con (4) son el producto ApoA1 correctamente cortado, mientras que las bandas marcadas con (5) H6Ubi son la pareja de fusión.

La figura 13 muestra la SDS-PAGE de las muestras de las incubaciones de H6-IEPD-TN123 + GrB-H6 tras 12 horas y 5 días sin adición de Ca²⁺. Algunas muestras se han reducido. Descripción de los carriles (A-N):

A: Marcador de peso molecular
B: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 1 µl de GrB-H6 tras 5 días de incubación, muestra reducida
C: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 10 µl de GrB-H6 tras 5 días de incubación, muestra reducida
D + E: H6-IEPD-TN123 solo, tras 5 días de incubación
F: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 1 µl de GrB-H6 tras 5 días de incubación
G: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 10 µl de GrB-H6 tras 5 días de incubación
H: GrB-H6 solo, diluido tal como en C y G
I: H6-IEPD-TN123 solo, tras 12 horas de incubación
J: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 1 µl de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
K: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 10 µl de GrB-H6 tras 12 horas de incubación
L: H6-IEPD-TN123 solo, tras 12 horas de incubación, muestra reducida
M: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 1 µl de GrB-H6 tras 12 horas de incubación, muestra reducida
N: 200 µl de H6-IEPD-TN123 + 10 µl de GrB-H6 tras 12 horas de incubación, muestra reducida

Los carriles I-K son idénticos a los carriles F-H en la figura 2 e I-K en la figura 3, es decir, muestras tras 12 horas de incubación con 0, 0,2 ó 2 mg de GrB-H6. Aquí el patrón de bandas (1) indica un sitio interno de corte en la parte

TN123 de H6-IEPD-TN123 y el patrón se explica en mayor detalle en la figura 12. Los carriles D-G muestran las incubaciones tras 5 días y en este caso la mayor parte de la proteína de fusión ha sido cortada. En el carril G (adición de 10 μ l de GrB-H6), prácticamente la totalidad de la proteína de fusión ha sido cortada dos veces (2); en la secuencia IEPD $\downarrow$, así como en el sitio interno en TN123 con la secuencia AQPD $\downarrow$.

5 Los carriles L-N y los carriles B-D muestran las mismas muestras tras 12 horas y tras 5 días, respectivamente, aunque en este caso las muestras se han reducido. Este patrón de bandas (3) también se explica en la figura 12 y nuevamente la práctica totalidad de la proteína de fusión ha sido cortada dos veces tras 5 días con 10 μ l de GrB-H6, carril C (4).

10 La figura 14 muestra la SDS-PAGE de las muestras de la incubación de H6-IEPD-TN123 + GrB-H6 tras 12 horas y 2 días sin adición de Ca^{2+} 5 mM. Algunas muestras se han reducido. Descripción de los carriles (A-K):

A: Marcador de peso molecular

B: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 y CaCl_2 5 mM, muestra reducida

15 C: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 y CaCl_2 5 mM, muestra reducida

D: H6-IEPD-TN123 solo

E: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 y CaCl_2 5 mM

F: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 y sin CaCl_2

G: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 y CaCl_2 5 mM

20 H: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 y sin CaCl_2

I: GrB-H6 solo, diluido tal como en G y H

J: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 1 μ l de GrB-H6 sin CaCl_2 tras 2 días de incubación

K: 200 μ l de H6-IEPD-TN123 + 10 μ l de GrB-H6 sin CaCl_2 tras 2 días de incubación

25 Los carriles B-H y J-K muestran las incubaciones de H6-IEPD-TN123 con GrB-H6 tras 12 horas y 2 días, respectivamente.

El carril D muestra H6-IEPD-TN123 no cortado. Al comparar los carriles E y G (+ Ca^{2+} 5 mM) con los carriles F y H (sin Ca^{2+}), sólo aparecen dos bandas en presencia de Ca^{2+} 5 mM (1), mientras que aparecen cuatro bandas (2) en ausencia de Ca^{2+} , tal como se indica para las figuras 2, 3, 10 y 12. Tras 12 horas de incubación con 10 μ l de GrB-H6, aproximadamente 40% de la proteína de fusión se había cortado correctamente en presencia de Ca^{2+} (carril G), mientras que el corte de los dos sitios en ausencia de Ca^{2+} se produce un poco más rápidamente (carril H tras 12 horas y K tras 2 días). En el carril K se ha cortado dos veces prácticamente la totalidad de la proteína de fusión (3). Las muestras en los carriles B y C se han reducido y todavía aparecen sólo dos bandas (4); H6-IEPD-TN123 no cortado y el producto correctamente cortado, en el que H6 ha sido eliminado.

35 La figura 15 muestra una representación esquemática del patrón de bandas observado en los geles de SDS-PAGE en las figuras 2, 3, 10 y 11.

(A): En ausencia de Ca^{2+} , el constructo H6-IEPD-TN123 se corta en dos sitios diferentes, indicado por "GrBH6 $\rightarrow$ ".

40 La pequeña secuencia N-terminal escindida es excesivamente pequeña para visualizarse en el gel. La molécula resultante consiste de dos cadenas polipeptídicas que se mantienen juntas mediante un enlace disulfuro.

(1) y (2): en un gel no reductor, se obtiene el patrón de bandas en (2) en caso de que el corte no sea completo.

45 (1) es H6-IEPD-TN123 no cortado, y en (2) la proteína de fusión no cortada que queda es la segunda banda contando desde la parte superior. La primera banda desde la parte superior en (2) es H6-IEPD-TN123 cortado en el sitio interno, AQPD $\downarrow$, que proporciona una molécula del mismo tamaño que H6-IEPD-TN123 no cortado, aunque menos compacta. La última banda es la proteína de fusión correctamente cortada, mientras que la tercera banda contando desde la parte superior es la proteína de fusión cortada dos veces, ambas en el sitio IEPD $\downarrow$ correcto y en el sitio interno AQPD $\downarrow$. Al cortarse en el sitio interno, la molécula es menos compacta y, por lo tanto, migra menos en el gel que la proteína de fusión correctamente cortada.

50 (3) and (4): al reducir las muestras, se observa el patrón de bandas en (4). En éste, se rompen los enlaces disulfuro, de manera que sólo se observan cadenas polipeptídicas separadas en el gel. (3) muestra la posición de H6-IEPD-TN123 reducido no cortado. La primera banda desde la parte superior en (4) es el H6-IEPD-TN123 no cortado que queda, mientras que la segunda banda contando desde la parte superior es H6-IEPD-TN123 reducido y correctamente cortado. Bajo las condiciones reductoras, las moléculas cortadas en el sitio interno ya no se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro y sólo puede observarse en el gel el mayor de los dos polipéptidos tras el corte interno. Por lo tanto, la tercera banda contando desde la parte superior es la parte más grande de la proteína de fusión cortada internamente, y la última banda es la parte más grande tras el corte en tanto el sitio interno como en el sitio IEPD $\downarrow$ correcto.

60 (B): al añadir Ca^{2+} mM a las incubaciones, no se observa el corte interno. Los iones de Ca^{2+} se unen a la molécula de H6-IEPD-TN123 de una manera que evita que GrB-H6 corte la proteína de fusión en el sitio interno AQPD $\downarrow$. Al resultar inaccesible el sitio AQPD $\downarrow$, el corte sólo se produce en el sitio IEPD $\downarrow$ correcto.

(5) y (6): al producirse sólo el corte en el sitio IEPD↓ correcto, se observa el patrón de bandas en (6). La posición de H6-IEPD-TN123 no cortado se muestra en (5), por lo que la primera banda desde la parte superior en (6) es el H6-IEPD-TN123 no cortado que queda. La última banda es la proteína de fusión cortada únicamente una vez en el sitio correcto. El pequeño péptido N-terminal es excesivamente pequeño para visualizarse en el gel.

La figura 16 muestra muestras de las incubaciones de tres de las cinco variantes de H6-TripUB con GrB-H6. Las tres variantes son H6-TripUB IEPD↓SP, H6-TripUB IQAD↓SP y H6-TripUB IQAD↓SG. Descripción de los carriles (A-P):

- A: Marcador de peso molecular
- B: H6-TripUB IEPD↓SP solo, tras 24 horas de incubación
- C: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 2 horas de incubación
- D: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 6 horas de incubación
- E: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
- F: 200 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 48 horas de incubación
- G: H6-TripUB IQAD↓SP solo, tras 24 horas de incubación
- H: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 2 horas de incubación
- I: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 6 horas de incubación
- J: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
- K: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 48 horas de incubación
- L: H6-TripUB IQAD↓SG solo, tras 24 horas de incubación
- M: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SG + 5 µl de GrB-H6 tras 2 horas de incubación
- N: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SG + 5 µl de GrB-H6 tras 6 horas de incubación
- O: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SG + 5 µl de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
- P: 200 µl de H6-TripUB IQAD↓SG + 5 µl de GrB-H6 tras 48 horas de incubación

En el carril B se muestra H6-TripUB IEPD↓SP no cortado, mientras que aparece cada vez más producto correctamente cortado en

los carriles C-F tras la incubación con GrB-H6. En el carril F tras 48 horas de incubación se había cortado correctamente aproximadamente 2/3 de la cantidad original de H6-TripUB IEPD↓SP no cortado. En los carriles G-K se muestran las muestras de H6-TripUB IQAD↓SP, proporcionando más o menos lo mismo que para H6-TripUB IEPD↓SP con H6-TripUB IQAD↓SP no cortado en el carril G y una cantidad creciente de producto correctamente cortado en los carriles H-K. Sin embargo, el corte es mucho más lento que el corte de la secuencia IEPD↓SP y sólo se ha cortado una cantidad reducida tras 48 horas de incubación. Para las muestras de H6-TripUB IQAD↓SG en los carriles L-P resulta evidente que el corte es mucho más rápido que para H6-TripUB IEPD↓SP y H6-TripUB IQAD↓SP. El carril L muestra H6-TripUB IQAD↓SG no cortado y ya tras sólo 2 horas de incubación la mayoría de la proteína de fusión ya había sido cortada, proporcionando el producto correcto.

La figura 17 muestra muestras de las incubaciones de dos de las cinco variantes de H6-TripUB con GrB-H6. Las dos variantes restantes eran H6-TripUB VGPD↓SP y H6-TripUB VGPD↓FG. Descripción de los carriles (A-K):

- A: H6-TripUB VGPD↓SP solo, tras 24 horas de incubación
- B: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 2 horas de incubación
- C: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 6 horas de incubación
- D: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
- E: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓SP + 5 µl de GrB-H6 tras 48 horas de incubación
- F: H6-TripUB VGPD↓FG solo, tras 24 horas de incubación
- G: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓FG + 5 µl de GrB-H6 tras 2 horas de incubación
- H: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓FG + 5 µl de GrB-H6 tras 6 horas de incubación
- I: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓FG + 5 µl de GrB-H6 tras 24 horas de incubación
- J: 200 µl de H6-TripUB VGPD↓FG + 5 µl de GrB-H6 tras 48 horas de incubación
- K: Marcador de peso molecular

En el carril A se encuentra H6-TripUB VGPD↓SP no cortado y en los carriles B-E se observa más y más producto correctamente cortado, tal como se observa para H6-TripUB IEPD↓SP (carriles B-F, figura 16). Aproximadamente la mitad de la cantidad de proteína de fusión se había cortado tras 48 horas. En el carril F se muestra H6-TripUB VGPD↓FG no cortado, y en los carriles G-J aparece el producto correctamente cortado de H6-TripUB VGPD↓FG. Tras sólo 2 horas de incubación se había cortado correctamente la totalidad de la proteína de fusión.

La figura 18 muestra muestras de las incubaciones de H6-TripUB IEPD↓SP, H6-TripUB IEPD↓TQ y H6-TripUB IEPD↓IV con GrB-H6 C228F en una proporción de proteasa:proteína de fusión de 1:500 a 23°C. Descripción de los carriles A-M:

A: Marcador de peso molecular

B: H6-TripUB IEPD↓SP, tras 0 horas de incubación

C: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 1 µl de GrB-H6 C228F tras 4 horas de incubación

D: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 1 µl de GrB-H6 C228F tras 24 horas de incubación

5 E: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓SP + 1 µl de GrB-H6 C228F tras 96 horas de incubación

F: H6-TripUB IEPD↓TQ, tras 0 horas de incubación

G: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓TQ + 1 µl de GrB-H6 C228F, 4 horas de incubación

H: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓TQ + 1 µl de GrB-H6 C228F, 24 horas de incubación

I: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓TQ + 1 µl de GrB-H6 C228F, 96 horas de incubación

10 J: H6-TripUB IEPD↓IV, 0 horas de incubación

K: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓IV + 1 µl de GrB-H6 C228F, 4 horas de incubación

L: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓IV + 1 µl de GrB-H6 C228F, 24 horas de incubación

M: 250 µl de H6-TripUB IEPD↓IV + 1 µl de GrB-H6 C228F, 96 horas de incubación

15 En los carriles B-E se muestra el corte de H6-TripUB IEPD↓SP (1), en el que corte se había completado prácticamente al 100% tras 96 horas. Los carriles F-I muestran el corte de H6-TripUB IEPD↓TQ (2), y éste se había completado aproximadamente al 100% tras sólo 24 horas. Igualmente para el corte de H6-TripUB IEPD↓IV (3) mostrado en los carriles J-M. Las bandas para H6-TripUB IEPD↓TQ inactivo y cortado se encontraban situados ligeramente más abajo en el gel que las bandas para H6-TripUB IEPD↓SP, ya que H6-TripUB IEPD↓TQ es un mutante por delección de H6-TripUB IEPD↓SP. Las bandas para H6-TripUB IEPD↓IV, otro mutante por delección, se encuentran situada todavía más abajo, ya que la delección es más grande que aquella en H6-TripUB IEPD↓TQ.

20

La figura 19, panel A, muestra muestras de las incubaciones de H6-TripUB IEPD↓SP y de H6-TripUB IEPD↓EP con GrBH6 C228F en la proporción de proteasa:proteína de fusión de 1:500 en un volumen total de 200 µl tanto a 21°C como a 37°C.

25 Descripción de los carriles A-O:

A: Marcador de peso molecular

B: H6-TripUB IEPD↓SP, tras 0 horas de incubación

30 C: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 21 °C, 4 horas

D: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 21 °C, 24 horas

E: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 21 °C, 48 horas

F: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 37 °C, 4 horas

G: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 37 °C, 24 horas

35 H: 24 mg de H6-TripUB IEPD↓SP + 0,048 mg de GrB-H6 C228F, 37 °C, 48 horas

I: H6-TripUB IEPD↓EP, 0 horas de incubación

J: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C228F, 21°C, 4 horas

K: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C228F, 21°C, 24 horas

L: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C228F, 21°C, 48 horas

40 M: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 4 horas

N: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C223F, 37°C, 24 horas

O: 36 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,072 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 48 horas

45 El H6-TripUB IEPD↓SP no cortado intacto se muestra en el carril B (1), mientras que los cortes a 21°C y a 37°C se muestran en los carriles C-E (2) y en los carriles F-H (3), respectivamente. No se observó prácticamente ninguna diferencia entre las dos temperaturas. Tras 48 horas, se había cortado aproximadamente 40% a 21°C. En el carril I (4) se muestra el H6-TripUB IEPD↓EP no cortado, mientras que las reacciones de corte a 21°C y a 37°C se muestran en los carriles J-L (5) y en los carriles M-O (6), respectivamente. Nuevamente no se observó prácticamente ninguna diferencia entre las dos temperaturas, y tras 48 horas a 21°C, aproximadamente 35-40% se había cortado, es decir GrB-H6 C228F corta ambos sustratos igualmente bien.

50

La figura 19, panel B, muestra muestras de las incubaciones de H6-TripUB IEPD↓EG y de H6-TripUB IEPD↓EP con GrBH6 C228F en la proporción de proteasa:proteína de fusión de 1:500 en un volumen total de 200 µl tanto a 21°C como a 37°C.

55 Descripción de los carriles A-O:

A: Marcador de peso molecular

B: H6-TripUB IEPD↓EG, 0 horas de incubación

60 C: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 6 horas

D: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 24 horas

E: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 50 horas

F: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 6 horas

G: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 24 horas

H: 40 mg de H6-TripUB IEPD↓EG + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 50 horas
 I: H6-TripUB IEPD↓EP, 0 horas de incubación
 J: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 6 horas
 K: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 24 horas
 L: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 23°C, 50 horas
 M: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 6 horas
 N: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 24 horas
 O: 38 mg de H6-TripUB IEPD↓EP + 0,08 mg de GrB-H6 C228F, 37°C, 50 horas

- 10 El H6-TripUB IEPD↓EG no cortado intacto se muestra en el carril B (1), mientras que los cortes a 21°C y a 37°C se muestran en los carriles C-E (2) y en los carriles F-H (3), respectivamente. Prácticamente no se observó ninguna diferencia entre las dos temperaturas, y tras sólo 6 horas se había completado el corte. Se muestra H6-TripUB IEPD↓EP no cortado en el carril I (4), mientras que las reacciones de corte a 21°C y a 37°C se muestran en los carriles J-L (5) y en los carriles M-O (6), respectivamente. Tal como en la figura 19, panel A, tras 50 horas a 21°C, se había cortado aproximadamente el 40%. Inesperadamente, GrB-H6 C228F cortaba el sustrato IEPD↓EG mucho mejor que IEPO↓SP y IEPD↓EP.

La figura 20 muestra muestras de la incubación de H6-TripUB IQAD↓SP o de H6-TripUB IQAD↓SG con las seis preparaciones diferentes de GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento A-F, descrito en el Ejemplo 9. Descripción de los carriles A-M:

- A: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento A
 B: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento B
 C: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento C
 D: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento D
 E: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento E
 F: H6-TripUB IQAD↓SP + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento F
 G: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento A
 H: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento B
 I: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento C
 J: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento D
 K: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento E
 L: H6-TripUB IQAD↓SG + GrB-H6 C228F inmovilizado, experimento F
 M: Marcador de peso molecular

Se muestra la incubación de H6-TripUB IQAD↓SP en los carriles A-F (1), mientras que las incubaciones de H6-TripUB IQAD↓SG se muestran en los carriles G-L (2). La banda que representa la proteína de fusión no cortada (H6-TripUB IQAD↓SP ó H6-TripUB IQAD↓SG) se marca con (3) y la posición de bandas de los productos correctamente cortados se marca con (4).

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño y construcción de vectores de expresión de granzima B humano

Con el fin de preparar constructos de pro-granzima B inactivo, se clonó una secuencia codificante de granzima B humano activado (E.C. 3.4.21.79), es decir, entre Ile21 (Ile16 en la numeración de quimotripsinógeno) y Tyr246, en un vector de clonación pT7 que contenía una etiqueta hexa-His (H6) C-terminalmente (pT7 C-term H6), resultando en el vector de expresión pT7-IEGR-GrB-H6. La secuencia, MGSIEGR, que contenía la secuencia de reconocimiento IEGFR del factor de coagulación sanguínea X_a (FX_a) se situó de esta manera inmediatamente en el lado N-terminal de Ile21 en el granzima B, proporcionando un sitio de corte de FX_a entre Arg (R) e Ile21. La proteína de fusión resultante de pro-granzima B que contenía la secuencia de reconocimiento de FX_a y la etiqueta hexa-His C-terminal en lo sucesivo se denomina pro-IEGR-GrB-H6 y se muestra en SEC ID n° 1.

Con el fin de formar proteínas de pro-granzima B autoactivadoras, se construyeron los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 y pT7-IEAD-GrB-H6, en los que se sustituyó la secuencia de reconocimiento FX_a, IEGR, por los sitios de reconocimiento de granzima B IEPD o IEAD, respectivamente. Las proteínas GrB autoactivadoras resultantes en lo sucesivo se denominan pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6, respectivamente, y se muestran en SEC ID n° 2 y SEC ID n° 3. El diseño y clonación de los vectores se describe de manera general en la sección siguiente.

La presencia de un cisteína libre en la posición aminoácida 228 (utilizando el sistema de numeración de aminoácidos de quimotripsinógeno estándar establecido) del granzima B humano y en particular las proteínas granzima B

anteriormente indicadas, pro-IEGR-GrB-H6, pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6, presenta el potencial de provocar complicaciones durante el procedimiento de replegamiento descrito en el Ejemplo 2, de reducir la estabilidad del enzima activado y de proporcionar una reactividad no enzimática más alta hacia los sustratos que contienen disulfuro. Por lo tanto, se generaron varias proteínas mutantes recombinantes basadas en pro-IEPD-GrB-H6 en las que el residuo aminoácido Cys228 (numeración de aminoácidos de quimotripsinógeno) se sustituyó por serina (S), alanina (A), treonina (T), valina (V) o fenilalanina (F) mediante mutación sitio-dirigida del constructo pT7-IEPD-GrB-H6, proporcionando los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 C228S, pT7-IEPD-GrB-H6 C228A, pT7-IEPD-GrB-H6 C228T, pT7-IEPD-GrB-H6 C228V y pT7-IEPD-GrB-H6 C228F, respectivamente. Las proteínas mutantes resultantes en lo sucesivo se denominan pro-IEPD-GrB-H6 C228S (SEC ID n° 4), pro-IEPD-GrB-H6 C228A (SEC ID n° 5), pro-IEPD-GrB-H6 C228T (SEC ID n° 6), pro-IEPD-GrB-H6 C228V (SEC ID n° 7) y pro-IEPD-GrB-H6 C228F (SEC ID n° 8), respectivamente, y colectivamente denominadas mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X. Todos estos mutantes se construyeron como proteasas granzima B autoactivadoras.

Construcción del vector de clonación pT7 C-term H6

El vector de clonación pT7 C-term H6 se construyó mediante ligación del fragmento de ADN generado a partir de los cebadores oligonucleótidos H6 C-term fw (SEC ID n° 9) y H6 C-term rev (SEC ID n° 10) en un vector cortado con NcoI y EcoRI, pT7 (Christensen J.H. et al., 1991) utilizando procedimientos estándares.

Clonación de granzima B humano en el vector de clonación pT7 C-term H6

Se construyó el vector de expresión pT7-IEGFR-GrB-H6 mediante ligación del fragmento de ADN GrB EcoRI cortado con BamHI y EcoRI amplificado a partir de una mezcla de ADNc, aislado a partir de médula ósea humana, leucocitos humanos, nódulos linfáticos humanos y células de linfoma (Raji) (Clontech Laboratories, Inc., n° de cat. 7181-1, 7182-1, 7164-1, 7167-1) (con los cebadores oligonucleótidos GrBfw (SEC ID n° 11) y GrBrev EcoRI (SEC ID n° 12) en el vector cortado con BamHI y EcoRI, pT7 C-term H6, utilizando procedimientos estándares. Se proporcionan descripciones generales de la secuencia de nucleótidos resultante de GrB EcoRI como SEC ID n° 13. Construcción de vectores de expresión para granzima B humano autoactivador, pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6

Los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 y pT7-IEAD-GrB-H6 codificantes de las proteínas pro-granzima B autoactivadoras se construyeron mediante la utilización del kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange™ (Stratagene, n° de catálogo 200518) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó a modo de molde el vector de expresión pT7-IEGR-GrB-H6. Se utilizaron los cebadores oligonucleótidos GrB GR-PD fw y GrB GR-PD rev (SEC ID n° 14 y 15) para la construcción de pT7-IEPD-GrB-H6 y los cebadores oligonucleótidos GrB GR-AD fw y GrB GR-AD rev (SEC ID n° 16 y 17) para la construcción de pT7-IEAD-GrB-H6.

Construcción de vectores de expresión para los mutantes de pro-IEPD-GrB-H6 C228X autoactivadores

Se construyeron los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 C228X codificantes de las proteínas mutantes pro-GrB-H6 C228X autoactivadoras mediante la utilización del kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange™ (Stratagene, n° de catálogo 200518) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó a modo de molde el vector de expresión pT7-IEPD-GrB-H6. Se utilizaron los cebadores oligonucleótidos degenerados GrB SAT fw y GrB SAT rev (SEC ID n° 18 y 19) para la construcción de pT7-IEPD-GrB-H6 C228S, pT7-IEPD-GrB-H6 C228A y pT7-IEPD-GrB-H6 C228T, en los que D=A, G o T y H=T, C o A en las secuencias de los cebadores GrB SAT fw y GrB SAT rev mostrados en la Tabla 1. Se utilizaron los cebadores oligonucleótidos degenerados GrB VF fw y GrB VF rev (SEC ID n° 20 y 21) para la construcción de pT7-IEPD-GrB-H6 C228V y pT7-IEPD-GrB-H6 C228F, en los que K=G o T y M=A o C en las secuencias de cebadores GrB VF fw y GrB VF rev mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores oligonucleótidos

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEC ID n°
H6 C-term fw	5'-CATGGACGGAAGCTTGAATTCACATCACCATCACCATCACTA ACGC-3'	9
H6 C-term rev	5'-AATTGCGTTAGTGATGGTGGTGGTGGTGGTGAATTCAGCTTC CGCT-3'	10
GrBfw	5'-CATGGGATCCATCGAGGGTAGGATCATCGGGGGACATG AG-3'	11
GrBrev EcoRI	5'-GCGTGAATTCAGGTACCGTTTCATGGTTTTCTTTATCG3'	12
GrB GR-PD fw	5'-TCCATCGAGCCGGATATCATCGGGGGACATGAG-3'	14

GrB GR-PD rev	5'-CCCCGATGATATCCGGCTCGATGGATCCCATATG-3'	15
GrB GR-AD fw	5'-TCCATCGAGGCTGATATCATCGGGGGACATGAG-3'	16
GrB GR-AD rev	5'-CCCCGATGATATCAGCCTCGATGGATCCCATATG-3'	17
GrB SAT fw	5'-TCCACGAGCADCCACCAAAGTCTCAAG-3'	18
GrB SAT rev	5'-AGACTTTGGTGGHGGCTCGTGGAGGC-3'	19
GrB VF fw	5'-TCCACGAGCCKTCACCAAAGTCTCAAG-3'	20
GrB VF rev	5'-AGACTTTGGTGAMGGCTCGTGGAGGC-3'	21

Ejemplo 2

Expresión y replegamiento del granzima B humano autoactivador

5

Pro-IEGR-GrB-H6 recombinante activable por FX_a

10

Se produjo la proteína de fusión de pro-granzima B recombinante activable por FX_a pro-IEGR-GrB-H6 (SEC ID n° 1) mediante el cultivo y expresión del vector de expresión pT7-IEGR-GrB-H6 preparado en el Ejemplo 1 en células de *E. coli* BL21 a una escala intermedia (3x1 litros), tal como describen Studier F.W. et al., 1990. Se infectaron cultivos en crecimiento exponencial a 37°C y DO₆₀₀=0,8 con bacteriófago λCE6 a una multiplicidad de aproximadamente 5. Se cultivaron los cultivos a 37°C y 50 minutos después de la infección se añadió 0,1 g/l de rifampicina (disuelta a 0,1 g/ml en metanol). Tras tres horas adicionales a 37°C, se recolectaron las células mediante centrifugación. Se lisaron las células mediante choque osmótico y sonicación y se extrajeron las proteínas celulares totales en fenol (ajustado a pH 8 con base Trisma). Se precipitaron las proteínas de la fase fenol mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol y centrifugación. El pellet de proteínas se disolvió en un tampón que contenía cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y ditiotretol 100 mM. Tras la filtración en gel en Sephadex™ G-25 Fine (Amersham Biosciences) en urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 5 mM, la preparación de proteínas brutas se aplicó a una columna de NTA-agarosa activada con Ni²⁺ (Ni²⁺-NTA-agarosa, Qiagen).

20

Tras la aplicación del extracto de proteínas brutas a la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa, la proteína de fusión, pro-IEGR-GrB-H6, se purificó respecto de la mayoría de proteínas de *E. coli* y del fago λ mediante lavado con un volumen de columna del tampón de carga seguido de un volumen de columna de urea 8 M, NaCl 0,5 M, fosfato sódico 50 mM, pH 6,3 y 2-mercaptoetanol 5 mM, 1/2 volumen de columna de cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y 2-mercaptoetanol 5 mM y finalmente 1/2 volumen de columna de urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y glutatión reducido 3 mM.

25

30

La proteína de fusión pro-IEGR-GrB-H6 se replegó en la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa utilizando el procedimiento de replegamiento cíclico descrito por Thøgersen et al. (solicitud de patente internacional n° WO 9418227). El perfil del gradiente se describe a continuación, en la Tabla 2, con NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, glutatión reducido 2 mM y glutatión oxidado 0,2 mM como tampón A y urea 6 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y glutatión reducido 3 mM como tampón B.

Tabla 2:

Etapas	Tiempo (min.)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B
1	0	2	100	0
2	45	2	100	0
3	46	2	0	100
4	52	2	0	100
5	60	2	100	0
6	105	2	100	0
7	106	2	4	96
8	113	2	4	96
9	120	2	100	0
10	165	2	100	0
11	166	2	8	92
12	172	2	8	92
13	180	2	100	0
14	225	2	100	0
15	226	2	10	90
16	232	2	10	90
17	240	2	100	0
18	285	2	100	0

ES 2 427 974 T3

19	286	2	12	88
20	292	2	12	88
21	300	2	100	0
22	345	2	100	0
23	346	2	14	86
24	352	2	14	86
25	360	2	100	0
26	405	2	100	0
27	406	2	16	84
28	412	2	16	84
29	420	2	100	0
30	465	2	100	0
31	466	2	18	82
32	472	2	18	82
33	480	2	100	0
34	525	2	100	0
35	526	2	20	80
36	532	2	20	80
37	540	2	100	0
38	585	2	100	0
39	586	2	22	78
40	592	2	22	78
41	600	2	100	0
42	645	2	100	0
43	646	2	24	76
44	652	2	24	76
45	660	2	100	0
46	705	2	100	0
47	706	2	30	70
48	713	2	30	70
49	720	2	100	0
50	765	2	100	0
51	766	2	35	65
52	772	2	35	65
53	780	2	100	0
54	825	2	100	0
55	826	2	40	60
56	832	2	40	60
57	840	2	100	0
58	885	2	100	0
59	886	2	45	55
60	892	2	45	55
61	900	2	100	0
62	945	2	100	0
63	946	2	50	50
64	952	2	50	50
65	960	2	100	0
66	1005	2	100	0
67	1006	2	55	45
68	1012	2	55	45
69	1020	2	100	0
70	1065	2	100	0
71	1066	2	60	40
72	1072	2	60	40
73	1080	2	100	0
74	1125	2	100	0
75	1126	2	60	40
76	1132	2	60	40
77	1140	2	100	0

78	1185	2	100	0
79	1186	2	60	40
80	1192	2	60	40
81	1200	2	100	0
82	1245	2	100	0
83	1246	2	65	35
84	1252	2	65	35
85	1260	2	100	0
86	1305	2	100	0
87	1306	2	65	35
88	1312	2	65	35
89	1319	2	100	0
90	1364	2	100	0
91	1365	2	65	35
92	1371	2	65	35
93	1378	2	100	0
94	1423	2	100	0

Tras completar el procedimiento de replegamiento cíclico, la proteína de fusión pro-IEGR-GrB-H6 se eluyó de la columna de Ni²⁺-NTA-agarosa con un tampón que contenía NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y EDTA 10 mM, pH 8.

Tras la elución de la columna de Ni²⁺-NTA, la proteína pro-IEGR-GrB-H6 se diluyó con 1 volumen de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, antes de ajustar el pH a 7 con HCl. A continuación, se aplicó la proteína a una columna de intercambio iónico SP Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). La proteína se eluyó en 10 volúmenes de columna con un gradiente lineal entre NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 y NaCl 1 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Las muestras del perfil de elución aparece como una única banda clara en el análisis de SDS-PAGE y migran con el peso molecular previsto de 27,4 kDa para pro-IEGR-GrB-H6 monomérico.

pro-IEPD-GrB-H6 autoactivador y pro-IEAD-GrB-H6

Se produjeron las proteínas de fusión de granzima B recombinantes autoactivadoras pro-IEPD-GrB-H6 (SEC ID nº 2) y pro-IEAD-GrB-H6 (SEC ID nº 3) mediante expresión a partir de los vectores pT7-IEPD-GrB-H6 y pT7-IEAD-GrB-H6 preparados en el Ejemplo 1, en el que la expresión, replegamiento y purificación se llevaron a cabo esencialmente tal como se ha indicado para proIEGR-GrB-H6, anteriormente.

La autoactivación de los dos enzimas, pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6, se siguió tal como se describe en el Ejemplo 3, posteriormente.

Mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X autoactivadores

Todos los mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X (SEC ID nº 4, 5, 6, 7 y 8) se expresaron a partir de los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 C228X esencialmente tal como se ha indicado para la expresión de pro-IEGR-GrB-H6, anteriormente. El replegamiento de los mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X también se llevó a cabo esencialmente tal como se ha indicado para pro-IEGR-GrB-H6, anteriormente, y la activación en una columna de intercambio catiónico se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente para pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6.

La purificación y activación completa de los mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X autoactivadores se llevó a cabo en sólo cuatro horas mediante la aplicación de la proteína replegada, todavía en la forma pro, a una columna de intercambio catiónico, SP Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences), el lavado durante cuatro horas con NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, y finalmente la elución de la proteína activada con NaCl 750 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Tras la elución, los mutantes activados se denominan GrBH6 C228S, GrB-H6 C228A, GrB-H6 C228T, GrB-H6 C228V y GrB-H6 C228F.

Los niveles de expresión de los mutantes pro-IEPD-GrB-H6 C228X eran similares al nivel de expresión de pro-IEPD-GrB-H6. Sin embargo, la eficiencia de replegamiento difería en hasta 90% respecto a la de pro-IEPD-GrB-H6. Un mutante, pro-IEPD-GrB-H6 C228S, presentaba una eficiencia de replegamiento muy baja y, por lo tanto, no se analizó adicionalmente. Lo anterior se opone a lo que se esperaba, ya que la elección conservadora evidente para la sustitución de un residuo cisteína sería serina, debido a que la serina es más similar a la cisteína de entre todos los aminoácidos naturales en las proteínas, tanto en tamaño como hidrofiliidad y químicamente.

La eficiencia de replegamiento de tres de los demás mutantes, pro-IEPD-GrB-H6 C228A, pro-IEPD-GrB-H6 C228T y

pro-IEPD-GrB-H6 C228V era similar a la de pro-IEPD-GrB-H6.

Un resultado muy interesante fue que la recuperación de proteínas más elevada tras el repliegamiento y purificación se obtuvo para el mutante pro-IEPD-GrB-H6 C228F, en el que la cisteína había sido sustituida por fenilalanina, y no con pro-IEPD-GrB-H6 no mutado, que comprendía el residuo aminoácido Cys228. De esta manera, al añadir 70 mg, estimados mediante ensayo de Bradford (kit de reactivos de ensayo de proteínas Coomassie® Plus, Pierce Biotechnology) utilizando albúmina de suero bovino como estándar de proteína, de pro-IEPD-GrB-H6 C228F o pro-IEPD-GrB-H6 no mutado al procedimiento de repliegamiento y purificación anteriormente descrito, se encontró que el rendimiento final (recuperación de proteínas) era de 1,5% y 0,5%, respectivamente. Ello demuestra claramente que pro-IEPD-GrB-H6 C228F mutado permite rendimientos finales de recuperación de proteínas mejores. El motivo para el menor rendimiento de recuperación podría ser que al aplicar la proteína pro-IEPD-GrB-H6 no mutada a la purificación y activación mediante cromatografía de intercambio catiónico, la proteína aparentemente tendía a precipitar y, de esta manera, reducía en rendimiento (recuperación) final de enzima activo. No se observó precipitación significativa de pro-IEPD-GrB-H6 C228F. Por lo tanto, la sustitución de cisteína 228 por fenilalanina aparentemente resulta favorable para el granzima B, en particular para el granzima B autoactivador. Ello resulta altamente inesperado, ya que el aminoácido fenilalanina es químicamente muy diferente de la cisteína y normalmente no sería la elección para una sustitución de cisteína.

Por lo tanto, los presentes inventores se centraron en los ejemplos siguientes en el mutante C228F, pro-IEPD-GrB-H6 C228F, junto con pro-IEGR-GrB-H6 para la comparación.

Ejemplo 3

Activación de la proteína de fusión pro-IEGR-GrB-H6 utilizando factor X_a bovino purificado y autoactivación de pro-IEPD-GrB-H6 y pro-tEAD-GrB-H6

Activación de pro-IEGR-GrB-H6 por el factor X_a

Se extrajo directamente del eluido de la columna de intercambio iónico SP Sepharose una muestra de pro-IEGR-GrB-H6 monomérico producido tal como se ha indicado en el Ejemplo 2.

Se activó un mg de pro-IEGR-GrB-H6 (en aproximadamente 10 ml) mediante la adición de 50 mg de FX_a (50 μ l a 1 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante varios días. El grado de corte/activación de pro-IEGR-GrB-H6 por FX_a , resultante de GrB-H6, se estimó mediante SDS-PAGE.

Además, se realizó un seguimiento de la actividad de granzima B durante una incubación de pro-IEGR-GrB-H6 con FX_a durante varios días utilizando el ensayo colorimétrico siguiente: 500 ml de tampón (NaCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0), 4 ml de Ac-IEPD-pNA 100 mM y 5 μ l de mezcla de incubación. La mezcla de incubación se preparó mediante la mezcla de 100 μ l de pro-IEGR-GrB-H6 (aproximadamente 10 mg) con 1 μ l de FX_a (1 mg/ml) y se mantuvo a 4°C durante la incubación. Se resumen los resultados en la Tabla 3 y en la figura 1.

Tabla 3:

Tiempo	Tiempo (horas)	$\Delta DO_{405}/\text{min}$
0 horas	0	0,0073
2 horas	2	0,0200
5 horas	5	0,0250
19 horas	19	0,0829
2 días	45	0,1325
5 días	120	0,1832

Para eliminar el FX_a añadido, la mezcla de incubación se cargó en una columna de intercambio iónico SP Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) lavando con NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. El FX_a no se unió al material de la columna, mientras que GrB-H6 resultante fue eluido de la columna con NaCl 750 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0.

Mediciones de actividad colorimétrica

Para determinar si el FX_a añadido había sido eliminado correctamente de la mezcla de incubación, se midió la actividad tanto de GrB-H6 como de FX_a antes y después de la eliminación del FX_a añadido, utilizando un ensayo colorimétrico con los sustratos S2222 (N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamyl-glicil-L-arginina-p-nitroanilina, Chromogenix, Italia, n° de cat. S2222) y Ac-IEPD-pNa (N-acetil-L-isoleucil-L-glutamyl-L-prolil-L-aspartil-p-nitroanilina, Calbiochem., La Jolla, USA, n° de cat. 368067), en donde se midió la absorbancia a 405 nm durante aproximadamente 3 minutos y se calculó $\Delta DO_{405}/\text{min}$. Se midió la actividad de FX_a utilizando la mezcla siguiente: 500 μ l de tampón, 25 μ l de

S2222 3 mM y 5 μ l de FX_a. Se midió la actividad de GrB-H6 utilizando la mezcla siguiente: 500 μ l de tampón, Ac-IEPD-pNa 2 100 mM y 5 μ l de GrB-H6.

- 5 El tampón utilizado era NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 ó HEPES 100 mM, pH 7,4. En la Tabla 3 se muestra un ejemplo en el que se utiliza tampón NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, en el que se utilizó la primera fracción desde la parte superior del eluido de SP Sepharose tras la eliminación del FX_a:

Tabla 4:

Antes de la eliminación de FX _a $\Delta DO_{405}/\text{min}$		Después de la eliminación de FX _a $\Delta DO_{405}/\text{min}$	
Actividad de GrB	Actividad de FX _a	Actividad de GrB	Actividad de FX _a
0,1401	0,0139	0,2213	0,0001

- 10 Tal como puede observarse en la Tabla 4, anteriormente, el FX_a añadido resultó completamente eliminado de la mezcla de activación mediante el intercambio iónico en la columna SP SepharoseTM Fast Flow: se obtuvo el mismo resultado con el tampón que comprendía HEPES 100 mM, pH 7,4.

Autoactivación de pro-IEPD-GrB-H6 y de pro-IEAD-GrB-H6

- 15 Se produjeron a partir de granzima B humano autoactivador recombinante los derivados IEPD-GrB-H6 y IEAD-GrB-H6 tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, mediante la utilización de los vectores de expresión pT7-IEPD-GrB-H6 y pT7-IEAD-GrB-H6 indicados en el Ejemplo 1. Las proteínas IEAD-GrB-H6 y IEPD-GrB-H6 se eluyeron de las columnas de SP Sepharose y se almacenaron a 4°C durante 2 días antes de determinar la actividad de las primeras fracciones respectivas mediante la utilización de un ensayo colorimétrico. Con este fin se preparó la mezcla siguiente: 500 μ l de tampón (HEPES 100 mM, pH 7,5), 2 μ l de Ac-IEPD-pNa 100 mM y 5 μ l de solución de proteína. A continuación, se determinó el cambio de absorbancia a 405 nm durante 3 minutos. Se determinó adicionalmente la actividad tras una incubación adicional durante 1 y 2 días a 4°C. Se resumen los resultados en la Tabla 5.

Tabla 5:

Proteína		$\Delta DO_{405}/\text{min}$
IEAD-GrB-H6	2 días	0,1372
IEPD-GrB-H6	2 días	0,1284
IEAD-GrB-H6	3 días	0,1607
IEPD-GrB-H6	3 días	0,1375
IEAD-GrB-H6	4 días	0,1983
IEPD-GrB-H6	4 días	0,1351

Tal como puede observarse a partir de la Tabla 5, los derivados autoactivadores pro-IEPD-GrB-H6 y pro-IEAD-GrB-H6 se activaron sin adición de granzima B previamente activado y la autoactivación no se completó hasta transcurridos por lo menos tres o cuatro días a 4°C.

30 Ejemplo 4

Actividad de granzima B determinada en sustrato péptido cromogénico pequeño

- 35 Se midió la actividad de GrB-H6 activado y purificado en diferentes tampones utilizando el sustrato Ac-IEPD-pNa: 500 μ l de tampón, 2 μ l de Ac-IEPD-pNa 100 mM y 5 μ l de GrB-H6. Se calculó $\Delta DO_{405}/\text{min}$ a partir de los primeros 0,75 minutos, a menos que se indique lo contrario.

Tabla 6:

Tampón	Cantidad aproximada de GrB-H6 añadida (μ g)	Actividad ($\Delta DO_{405}/\text{min}$)
TN pH 8,1	1	0,2213 (1 min)
TN pH 7,0	1	0,2794
TN pH 7,4	1	0,2930
		0,2624
	0,5	0,0835
		0,1082
	0,2	0,0245 (3 min)

TN pH 7,4 + TWEEN20 al 0,1%	0,5	0,0887
	0,2	0,0303 (3 min)
TN pH 7,4 + Ca^{2+} 5 mM	0,5	0,1401
TN pH 7,4 + Mg^{2+} 5 mM	0,5	0,1491
HEPES 100 mM pH 7,5	0,5	0,2350
HEPES 100 mM pH 7,5 + Ca^{2+} 5 mM	0,5	0,2425
HEPES 100 mM pH 7,2	0,5	0,1970
HEPES 100 mM pH 7,4	0,5	0,2273
		0,2328
HEPES 100 mM pH 7,4 + KCl 50 mM	0,5	0,2167
HEPES 100 mM pH 7,4 + NaCl 50 mM	0,5	0,1993
		0,1938
NaCl 100 mM, 50 mM Tris-HCl pH 7,4	0,5	0,1682
NaCl 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,4	0,5	0,1948
KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4	0,5	0,1662
TN = NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM		

Tal como puede observarse a partir de la Tabla 6, anteriormente, HEPES 100 mM, pH 7,4-7,5, fue el mejor tampón para la actividad de GrB-H6 de entre los tampones evaluados.

- 5 En un experimento posterior de barrido de pH realizado con GrB-H6 C228F, se encontró que el pH óptimo para la actividad hacia el sustrato Ac-IEPD-pNA se encontraba comprendido en el intervalo de pH de entre 7,5 y 7,8 en HEPES 100 mM.

- 10 Con el fin de estimar los parámetros cinéticos del equilibrio K_M y k_{cat} , se utilizó el mismo ensayo colorimétrico que el indicado anteriormente, con un volumen total de 500 μl en la cubeta de ensayo. El tampón de ensayo era HEPES 100 mM, pH 7,75, y se utilizó tanto GrB-H6 como GrB-H6 C228F a una concentración de 20 nM en cada medición. Para construir un gráfico de Lineweaver-Burk se utilizaron las concentraciones de sustrato siguientes: 5, 40, 150, 300 y 600 mM. Se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 7, a continuación:

- 15 Tabla 7:

	GrB-H6	GrB-H6 C228F
K_M (μM)	66,9	27,0
k_{cat} (s^{-1})	5,03	4,85
k_{cat} / K_M ($10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	7,5	18,0

Los valores obtenidos para K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M mostrados en la Tabla 7 anterior para GrB-H6 y GrB-H6 C228F eran muy similares a los valores encontrados para GrB de rata recombinante (Harris J.L. et al., 1998).

- 20 Ejemplo 5

Estimación de la especificidad de GrB-H6 y GrB-H6 C228F y de la estabilidad de GrB-H6 C228F

Especificidad de GrB-H6 y GrB-H6 C228F

- 25 Se examinó la especificidad de las proteasas GrB-H6 y GrB-H6 C228F utilizando los sustratos cromogénicos Ac-LEED-pNA, Ac-VEID-pNA, Ac-YVAD-pNA y Ac-DEVD-pNA, además del sustrato Ac-IEPD-pNA aplicado en el Ejemplo 4. Se llevó a cabo nuevamente el ensayo de actividad en 500 μl de HEPES 100 mM, pH 7,75 a una concentración de sustrato de 400 mM. Para cada medición se añadió 1 mg de proteasa a la cubeta de ensayo.
- 30 Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y las actividades obtenidas se normalizaron fijando la actividad medida de Ac-IEPD-pNA en el 100%. Se muestran los resultados en la figura 2. Puede observarse que la proteasa GrB-H6 es por lo menos tan específica como la proteasa GrB-H6 C228F.

Estabilidad de GrB-H6 C228F

- 35 Con el fin de determinar la estabilidad de la proteasa GrB-H6 C228F, se incubaron muestras de GrB-H6 C228F en

HEPES 100 mM, pH 7,4, durante 15 días a 4°C, a 23°C y a 37°C. Se seleccionó el tampón HEPES 100 mM con el fin de examinar cualquier autocorte y degradación, aunque no se observó "canibalismo" significativo, según se evaluó mediante SDS-PAGE (ver la figura 3A). También se midió la actividad hidrolítica del sustrato cromogénico Ac-IEPD-pNA durante dicho periodo de incubación; ver la figura 3B.

La proteasa GrB-H6 C228F es notablemente estable a 4°C y a 23°C. La actividad sólo cae ligeramente, en aproximadamente 10%, a 23°C durante los 15 días, y prácticamente no son visibles fragmentos de degradación en el gel. Incluso a 37°C todavía queda una actividad de aproximadamente 20% tras 15 días y sólo aparece unos pocos fragmentos de degradación en el gel.

También se ha encontrado que la proteasa GrB-H6 C228F en una escala de tiempo corta, de 10 minutos, es estable hasta a 50°C (resultados no mostrados). En el presente experimento se incubó una muestra de la proteasa durante 10 minutos a una temperatura dada y después se retornó a la temperatura ambiente mediante 10 minutos de incubación a 23°C. A continuación, se midió a 23°C la actividad hacia Ac-IEPD-pNA. Hasta una temperatura de incubación de 50°C la proteasa puede revertir a una actividad de prácticamente el 100% tras la incubación a temperatura ambiente (23°C), pero después de su exposición a una temperatura superior a 50°C, la proteasa ya no puede revertir a una forma activa y sólo puede detectarse una actividad muy reducida.

Ejemplo 6

Diseño y construcción de vectores de expresión para proteínas de fusión que contienen una secuencia de reconocimiento cortable por GrB-H6 y por GrB-H6 C228F

Con el fin de preparar proteínas de fusión adecuadas como sustratos para GrB-H6 y GrB-H6 C228F, la secuencia de reconocimiento de FX1 en las proteínas de fusión cortables por FXa H6-FX-TripBUB, H6-IEGR-RAP, H6Ubi-IEGR-ApoA1 y H6-FX-TN123 (codificadas por pT7H6-FX-TripBUB, pT7H6-FX-RAP, pT7H6Ubi-FX-ApoA1 y pT7H6-FX-TN123, respectivamente) se modificó de IEGR ó IQGR a IEPD, proporcionando los constructos H6-TripUB IEPD↓SP (SEC ID nº 22), H6-IEPD-RAP (SEC ID nº 23), H6Ubi-IEPD-ApoA1 (SEC ID nº 24) y H6-IEPD-TN123 (SEC ID nº 25).

En el constructo H6-TripUB IEPD↓SP, la secuencia de reconocimiento de granzima B es IEPD↓SP, en la que ↓ indica el sitio de corte. Esta secuencia de reconocimiento se encuentra situada entre H6 y la fracción TripUB del constructo, en donde los dos residuos, SP, C-terminalmente al enlace escindible forman la parte N-terminal de la fracción TripUB.

La secuencia de reconocimiento en las proteínas de fusión H6-TripUB siguientes (denominadas variantes H6-TripUB) se indica al final del nombre, como XXXX↓YY, en donde XXXX es la parte de la secuencia de reconocimiento del granzima B entre la fracción hexa-His, H6, y la fracción TripUB, y en la que los residuos YY son una parte de la fracción TripUB.

El sitio de corte en IEPD↓SP en el constructo H6-TripUB IEPD↓SP se modificó formando ocho otros sitios de corte, proporcionando las variantes siguientes: H6-TripUB IQAD↓SP (SEC ID nº 26), H6-TripUB IQAD↓SG (SEC ID nº 27), H6-TripUB VGPD↓SP (SEC ID nº 28), H6-TripUB VGPD↓FG (SEC ID nº 29), H6-TripUB IEPD↓TQ (SEC ID nº 30), H6-TripUB IEPD↓IV (SEC ID nº 31), H6-TripUB IEPD↓EP (SEC ID nº 32) y H6-TripUB IEPD↓EG (SEC ID nº 33), en las que ↓ indica el sitio de corte. En seis de dichos ocho constructos, se modificaron los sitios P1' y P2' (ambos parte de la fracción TripUB) de la proteína de fusión, es decir en H6-TripUB IQAD↓SG, H6-TripUB VGPD↓FG, H6-TripUB IEPD↓TQ, H6-TripUB IEPD↓IV, H6-TripUB IEPD↓EP y H6-TripUB IEPD↓EG.

Construcción de vectores de expresión de proteínas de fusión

El vector de expresión pT7H6-TripUB IEPD↓SP se construyó mediante la utilización del kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange™ (Stratagene, nº de catálogo 200518) siguiendo el protocolo del fabricante con el vector pT7H6-FX-TripBUB (solicitud de patente internacional nº WO 9856906) como molde y los cebadores oligonucleótidos: TripUB GrB fw (SEC ID nº 34) y TripUB GrB rev (SEC ID nº 35).

El vector de expresión pT7H6-IEPD-RAP se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-FX-RAP (Nykjær et al., 1992) como molde y los cebadores oligonucleótidos: RAP GrB fw (SEC ID nº 36) y RAP GrB rev (SEC ID nº 37).

El vector de expresión pT7H6Ubi-IEPD-ApoA1 se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6Ubi-FX-ApoA1 (solicitud de patente internacional nº WO0238609) como molde y los cebadores oligonucleótidos: Mut-GrB fw (SEC ID nº 38) y Mut-GrB rw (SEC ID nº 39).

El vector de expresión pT7H6-IEPD-TN123 se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-FX-TN123 (Hottet et al., 1997) como molde y los cebadores oligonucleótidos: TN GrB fw (SEC ID nº 40) y TN GrB rev (SEC ID nº 41).

- 5 El vector de expresión pT7H6-TripUB IQAD↓SP se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-FX-TripBUB (documento nº WO 9856906) como molde y los cebadores oligonucleótidos: PC7TripUB GR-AD fw (SEC ID nº 42) y PC7TripUB GR-AD rev (SEC ID nº 43).

- 10 El vector de expresión pT7H6-TripUB IQAD↓SG se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-TripUB IQAD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: PC7TripUB P-G fw (SEC ID nº 44) y PC7TripUB P-G rev (SEC ID nº 45).

- 15 El vector de expresión pT7H6-TripUB VGPD↓SP se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-TripUB IEPD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: DNATrip IE-VG fw (SEC ID nº 46) y DNATrip IE-VG rev (SEC ID nº 47).

- 20 El vector de expresión pT7H6-TripUB VGPD↓FG se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-TripUB VGPD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: DNATrip SP-FG fw (SEC ID nº 48) y DNATrip SP-FG rev (SEC ID nº 49).

- 25 Se construyó el vector de expresión pT7H6-TripUB1 EPO.J.TQ mediante una reacción de PCR con el vector pT7H6TripUB IEPD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: Trip IEPD-TQ (SEC ID nº 50) y UB3 (SEC ID nº 52). El producto de PCR resultante se digirió con BamHI e HindIII y se ligó en un vector pT7H6(GS)3 cortado con BamHI-HindIII (Christensen J.H. et al., 1991).

- 30 Se construyó el vector de expresión pT7H6-TripUB IEPD↓IV mediante una reacción de PCR con el vector pT7H6TripUB IEPD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: Trip IEPD-IV (SEC ID nº 51) y UB3 (SEC ID nº 52). El producto de PCR resultante se digirió con BamHI e HindIII y se ligó en un vector pT7H6(GS)3 cortado con BamHI-HindIII (Christensen J.H. et al., 1991).

- El vector de expresión pT7H6-TripUB IEPD↓EP se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-TripUB IEPD↓SP como molde y los cebadores oligonucleótidos: TripUB EP fw (SEC ID nº 53) y TripUB EP rev (SEC ID nº 54).

- 35 El vector de expresión pT7H6-TripUB IEPD↓EG se construyó mediante mutagénesis sitio-dirigida tal como se ha indicado anteriormente con el vector pT7H6-TripUB IEPD↓EP como molde y los cebadores oligonucleótidos: TripUB EG fw (SEC ID nº 55) y TripUB EG rev (SEC ID nº 56).

Tabla 8: Cebadores oligonucleótidos

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEC ID nº
TripUB GrB fw	5'-GTGGATCCATCGAGCCTGACTCTCCTGGTACCGAGCC-3'	34
TripUB GrB rev	5'-GGTACCAGGAGAGTCAGGCTCGATGGATCCACTACCAC-3'	35
RAP GrB fw	5'-CGGATCCATCGAGCCTGACTACTCGCGGGAGAAG-3'	36
RAP GrB rev	5'-CCCGCGAGTAGTCAGGCTCGATGGATCCGTGATG-3'	37
Mut-GrB fw	5'-CGTGGTGGATCCATCGAGCCGGACGGTGGAGATGAACCC CCC-3'	38
Mut-GrB rw	5'-GGGGGGTTCATCTCCACCGTCCGGCTCGATGGATCCACC ACG-3'	39
TN GrB fw	5'-GGATCCATCGAGCCTGACGGCGAGCCACCAACC-3'	40
TN GrB rev	5'-GGCTCGCCGTCAGGCTCGATGGATCCGTGATGG-3'	41
PC7TripUB GR-AD fw	5'-GGATCCATCCAGGCAGACTCTCCTGGTACCGAG-3'	42
PC7TripUB GR-AD rev	5'-GTACCAGGAGAGTCTGCCTGGATGGATCCACTAC-3'	43
PC7TripUB P-G fw	5'-GGATCCATCCAGGCAGACTCTGGTGGTACCGAGCCAC-3'	44
PC7TripUB P-G rev	5'-CTCGGTACCACAGAGTCTGCCTGGATGGATCCACTAC-3'	45
DNATrip IE-VG fw	5'-GTAGTGGATCAGTCGGGCCTGACTCTCCTGGTAC-3'	46
DNATrip IE-VG rev	5'-GAGAGTCAGGCCCGACTGATCCACTACCACTACC-3'	47
DNATrip SP-FG fw	5'-GGCCTGACTTTGGTGGTACCGAGCCACCAAC,3'	48
DNATrip SP-FG rev	5'-GGCTCGGTACCACCAAAGTCAGGCCCGACTG-3'	49

Trip IEPD-TQ	5'-GGGAAAGGATCCATCGAGCCTGACACCCAGAAGCCCAA GAAGATTGTAAATG-3'	50
Trip IEPD-IV	5'-GGGAAAGGATCCATCGAGCCTGACATTGTAAATGCCAAG AAAGATGTTGTGAAC-3'	51
UB3	5'-CGCAAGCTTGCATGCTTAGGATCCACCACGAAGTCTCAA-3'	52
TripUB EP fw	5'-CGAGCCTGACGAGCCTGGTACCGAGCCAC-3'	53
TripUB EP rev	5'-CGGTACCAGGCTCGTCAGGCTCGATGGATC-3'	54
TripUB EG fw	5'-CCTGACGAGGGTGGTACCGAGCCACCAAC-3'	55
TripUB EG rev	5'-GCTCGGTACCACCTCGTCAGGCTCGATG-3'	56

Ejemplo 7

Expresión, purificación y repliegamiento de proteínas de fusión que contienen una secuencia de reconocimiento cortable por GrB-H6 y por GrB-H6 C228F

Expresión de las proteínas de fusión

Para preparar las proteínas de fusión quiméricas H6-TripUB IEPD↓SP, H6-IEPD-RAP, H6-IEGR-RAP, H6Ubi-IEPD-ApoA1, H6Ubi-(EGR-ApoA1, H6-IEPD-TN123 y las variantes H6-TripUB, se cultivaron los vectores de expresión pT7H6-TripUB IEPD↓SP, pT7H6-IEPD-RAP, pT7H6-FX-RAP, pT7H6Ubi-IEPD-ApoA1, pT7H6Ubi-IEGR-ApoA1, pT7H6-IEPD-TN123, pT7H6-TripUB IQAD↓SP, pT7H6-TripUB IQAD↓SG, pT7H6-TripUB VGPD↓SP, pT7H6-TripUB VGPD↓FG, pT7H6-TripUB IEPD↓TQ, pT7H6-TripUB IEPD↓IV, pT7H6-TripUB IEPD↓EP, y pT7H6-TripUB IEPD↓EG (denominándose los ocho últimos variantes H6-TripUB) a escala intermedia (3 litros; 2x medio TY, MgSO₄ 5 mM y 0,1 mg/ml de ampicilina) en células *E. coli* BL21, tal como ha sido descrito por Studier F.W. et al., 1990. Se infectaron cultivos en crecimiento exponencial a 37°C y DO₆₀₀=0,8 con bacteriófago λCE6 a una multiplicidad de aproximadamente 5. Se cultivaron los cultivos a 37°C durante cuatro horas adicionales y se recolectaron las células mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en 100 µl de NaCl 750 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8 y EDTA 1 mM, pH 8. Se añadió a cada una fenol (150 µl ajustado a pH 8 con base Trisma) y las mezclas se sonicaron para extraer las proteínas totales. Tras clarificar mediante centrifugación (25 minutos a 10.000xg), las fracciones proteínas brutas se precipitaron de las fases de fenol mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol al 96% y centrifugación. Los pellets de proteínas se disolvieron en 75 µl de cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y ditiotretitol (DTT) 100 mM.

Purificación de las variantes H6-TripUB IEPD↓SP, H6-IEPD-RAP, H6-IEGR-RAP, H6Ubi-IEPD-ApoA1, H6Ubi-IEPD-ApoA1 y H6-TripUB

Tras la filtración en gel en Sephadex™ G-25 Fine (Amersham Biosciences) en urea 8 M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM, las preparaciones en bruto de las proteínas de fusión H6-IEPD-TripUB y H6-IEPD-RAP se aplicaron mediante adsorción por lotes a columnas de NTA-agarosa activada con Ni²⁺ (Ni²⁺-NTA-agarosa, Qiagen) (habitualmente con un volumen de columna de 50 a 75 µl) para la purificación (Hochuli E. et al., 1988). La columna se lavó con lo siguiente:

1. 2 x volumen de columna de urea 8 M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM
2. 1 x volumen de columna de urea 8 M, NaCl 500 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 6,3, y 2-mercaptoetanol 10 mM
3. 1 x volumen de columna de cloruro de guanidinio 6 M y Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM
4. 2 x volumen de columna de NaCl 500 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 8

A continuación, las proteínas de fusión purificadas se eluyeron con NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM.

Purificación y repliegamiento de proteínas de fusión H6-IEPD-TN123

Tras la filtración en gel en Sephadex™ G-25 Fine (Amersham Biosciences) en urea 8 M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM, las preparaciones en bruto de las proteínas de fusión H6-IEPD-TN123 se aplicaron mediante adsorción por lotes a columnas de NTA-agarosa activadas con Ni²⁺ (Ni²⁺-NTA-agarosa, Qiagen) (habitualmente con un volumen de columna de 50 a 75 µl) para la purificación y el repliegamiento in vitro. La columna se lavó con lo siguiente:

1. 2 x volumen de columna de urea 8 M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM
2. 1 x volumen de columna de urea 8 M, NaCl 500 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 6,3, y 2-mercaptoetanol 10 mM

3. 1 x volumen de columna de cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y 2-mercaptoetanol 10 mM

A continuación, cada proteína de fusión se sometió a un procedimiento iterativo de replegamiento tal como se ha descrito para el dominio kringle-4 del plasminógeno por Thøgersen et al. (solicitud de patente internacional n° WO 9418227). Tras completar el procedimiento de replegamiento, cada proteína de fusión replegada seguidamente se eluyó de la Ni^{2+} -NTA-agarosa en NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 10 mM.

Las fracciones de cada proteína de fusión replegada se filtraron en gel en NaCl 50 mM, acetato sódico 25 mM, pH 5,0 y CaCl_2 1 mM, y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico en SP Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences, 1,6 (D.I.) en columna de 20 centímetros) utilizando un gradiente salino entre NaCl 50 mM, acetato sódico 25 mM, pH 5,0 y CaCl_2 1 mM, y acetato sódico 25 mM, pH 5,0, CaCl_2 1 mM.

A continuación se llevó a cabo la purificación final de cada proteína de fusión correctamente plegada, mediante filtración en gel en NaCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8, y CaCl_2 1 mM, seguido de cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose™ Fast Flow (American Biosciences, 1,6 (D.I.) en columna de 20 centímetros) utilizando un gradiente salino entre NaCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8 y CaCl_2 1 mM, y NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8, y CaCl_2 1 mM.

Ejemplo 8

Corte de proteínas de fusión preparadas, con GrB-H6, GrB-H6 C228F y FX_a

Corte de H6-TripUB IEPD↓SP por GrB-H6

La proteína de fusión H6-TripUB IEPD↓SP (preparada tal como se indica en el Ejemplo 7) eluida de la columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa se filtró en gel en HEPES 100 mM, pH 7,5 y se incubaron muestras de 200 μl de la fracción superior a temperatura ambiente con 0, 1 ó 10 μg de GrB-H6 activado (aproximadamente 0, 0,2 y 2 mg de GrB-H6).

Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 12, 19 y 24 horas de incubación y se muestran geles en las figuras 4 y 5.

Sólo aparece el producto correctamente cortado en los carriles C-D en la figura 4 y en los carriles C-G en la figura 5, y cuanto mayor es el tiempo de incubación, más producto de corte aparece en los carriles, tanto para la adición de 1 como de 10 ml de GrB-H6. El patrón de bandas simple observado se explica en la figura 6. A partir de éste resulta evidente que GrB-H6 cortó H6-TripUB IEPD↓SP específicamente en un único sitio. El corte en el sitio correcto después de la secuencia IEPD se confirmó en el carril E en la figura 4, en el que el constructo H6-FX-TripUB, que contiene el sitio de reconocimiento de FX_a IQGR, en lugar del sitio de reconocimiento de GrB IEPD, resultó cortado por FX_a , proporcionando un producto del mismo tamaño que H6-TripUB IEPD↓SP cortado por GrB-H6.

Efecto de la temperatura y de la adición de Ni^{2+} y NTA sobre el corte de H6-TripUB IEPD↓SP por GrB-H6

Con la proteína de fusión H6-TripUB IEPD↓LSP, se establecieron las nueve incubaciones siguientes (Tabla 9) utilizando 200 μl H6-TripUB IEPD↓SP y 5 μl GrB-H6 (aproximadamente 1 μg GrB-H6) para cada incubación.

Tabla 9:

1	Sin adición	23°C
2	Ni^{2+} 4,2 mM	
3	Ni^{2+} 4,2 mM + NTA 5 mM	
4	Sin adición	37°C
5	Ni^{2+} 4,2 mM	
6	Ni^{2+} 4,2 mM + NTA 5 mM	
7	Sin adición	42°C
8	Ni^{2+} 4,2 mM	
9	Ni^{2+} 4,2 mM + NTA 5 mM	

Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 2, 7 y 22 horas de incubación, ver las figuras 7, 8 y 9.

Se contempló que los iones Ni^{2+} unirían la cola hexa-His (H6) N-terminal de la proteína de fusión y facilitarían el acceso al sitio de corte reconocido por GrB-H6. Además, los iones Ni^{2+} también se unirían a la cola hexa-His C-terminal del constructo GrB-H6. Se llevó a cabo la adición de NTA para enmascarar los iones Ni^{2+} en solución de una manera similar a cómo ocurre sobre las perlas de Ni^{2+} -NTA-agarosa, es decir para simular las condiciones en la columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa.

La figura 7 muestra las incubaciones a 23°C; la figura 8 a 37°C y la figura 9 a 42°C. En el caso de que no se añadiese Ni^{2+} o NTA, la proteína de fusión H6-TripUB IEPD↓SP resultó cortada de manera similar a lo observado en las figuras 4 y 5, aunque tras 22 horas aparentemente la incubación a 37°C era la mejor de las tres temperaturas sometidas a ensayo.

Con la adición de Ni^{2+} 4,2 mM, precipitó cierta cantidad de proteínas a las temperaturas más altas, de 37°C y 42°C, pero no se observó precipitación a 23°C. Por ello no se observó corte adicional de la proteína de fusión en el gel tras 2 horas de incubación a dichas temperaturas, en donde aparentemente precipitó cierta cantidad de H6-TripUB IEPD↓SP y de GrB-H6. A 23°C resultó cortada más proteína de fusión tras 22 horas que sin adición de Ni^{2+} .

El problema de precipitación observado se eliminó mediante la adición de NTA 5 mM a las incubaciones. Tras 22 horas de incubación a 23°C, se había cortado más proteína de fusión que sin adición de Ni^{2+} o NTA, de manera que la adición de Ni^{2+} y NTA aparentemente acelera la reacción de corte. Mediante el incremento adicional de la temperatura a 37°C y a 42°C se observa un incremento todavía mayor de la velocidad de corte. Tras 22 horas de incubación a 37°C prácticamente la totalidad de la proteína de fusión había sido cortada formando el producto correcto. Resultó cortada un poco menos a 42°C tras 22 horas.

De la comparación entre la velocidad de corte estimada inicialmente en los experimentos mostrados en las figuras 4 y 5 y la velocidad de corte observada en la presente memoria, resulta evidente que la adición de Ni^{2+} y NTA, así como la incubación a 37°C acelera drásticamente el corte específico de H6-TripUB IEPD↓SP por parte de GrB-H6.

Corte de H6-IEPD-RAP por GrB-H6

La proteína de fusión H6-IEPD-RAP (preparada tal como se indica en el Ejemplo 7) eluida de la columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa se filtró en gel en HEPES 100 mM, pH 7,4 y se incubaron muestras de 200 µl de la fracción superior a temperatura ambiente con 0, 1 ó 10 µl de GrB-H6 activado (aproximadamente 0, 0,2 y 2 mg de GrB-H6). Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 5, 23 y 26 horas de incubación, ver la figura 10.

Tras sólo 5 horas de incubación con 1 ó 10 µl de GrB-H6 tal como se ha indicado anteriormente, resultó cortada la totalidad de H6-IEPD-RAP, proporcionando el producto final. También resulta evidente que se produce por lo menos un sitio interno de corte en RAP, aunque este sitio interno se corta a mucha menos velocidad que la secuencia IEPD. Puede observarse que GrB-H6 escindió H6 correctamente en la secuencia IEPD mediante la comparación del tamaño del producto con muestras purificadas de H6-FX-RAP cortado parcialmente (carril H) o completamente (carril I) por FX_a , proporcionando el producto RAP final. En estos carriles, los productos de degradación de cualquier corte interior por FX_a han sido eliminados mediante purificación.

Comparación entre el corte de H6-IEPD-RAP por GrB-H6 y el corte de H6-IEGR-RAP por FX_a

El corte de H6-IEPD-RAP por GrB-H6 se comparó con el corte de H6-IEGR-RAP por FX_a . Tanto H6-IEPD-RAP como H6-IEGR-RAP se encontraban en HEPES 100 mM, pH 7,4, y se prepararon las incubaciones siguientes a temperatura ambiente, 23°C, con una proporción de proteasa:proteína de fusión de 1:1.000:

1. 400 µl (aprox. 500 mg) de H6-IEGR-RAP + 0,5 µl de FX_a (1 mg/ml) (aprox. 0,5 mg)
2. 400 µl (aprox. 400 mg) de H6-GrB-RAP + 2 µl de GrB-H6 (aprox. 0,4 mg)

Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 0, 1/2, 1, 3, 5, 7 y 27 horas de incubación, ver la figura 11.

Resulta evidente que ambas proteínas de fusión fueron cortadas muy rápidamente por su proteasa respectiva. Tras sólo 1/2 hora prácticamente la totalidad de la proteína de fusión había sido cortada, proporcionando el producto correcto para ambas incubaciones.

Sin embargo, para la incubación de H6-IEGR-RAP + FX_a , la totalidad de la proteína de fusión se había degradado, proporcionando una diversidad de trozos más pequeños tras 27 horas y no quedaba producto correctamente cortado.

En la incubación de H6-IEPD-RAP + GrB-H6 también se observan fragmentos de degradación, aunque no tantos como en la incubación de H6-IEGR-RAP + FX_a . Aparentemente sólo existe un sitio sensible a GrB en RAP de entre 19 sitios posibles (19 residuos Asp en el producto RAP), mientras que existen varios sitios sensibles a FX_a (26 posibles sitios, 26 residuos Arg). Lo anterior enlentece la degradación de H6-IEPD-RAP por parte de GrB-H6, de manera que todavía se encuentra presente bastante producto correctamente cortado (aprox. 25%) tras 27 horas de incubación.

En resumen, el corte correcto de la proteína de fusión RAP por GrB-H6 es igual de rápido por FX_a, mientras que la degradación de la proteína de fusión RAP por GrB-H6 es mucho más lenta que la degradación por FX_a. En el presente ejemplo, por lo tanto, la proteasa GrB-H6 es superior a FX_a, y demuestra que GrB-H6 es una proteasa muy específica.

Comparación entre el corte de H6Ubi-IEPD-ApoA1 por GrB-H6 C228F y el corte de H6Ubi-IEGR-ApoA1 por FX_a

Para las reacciones de corte de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + GrB-H6 C228F y H6Ubi-IEGR-ApoA1 + FX_a, la proporción de proteasa:sustrato nuevamente era de 1:1.000 y se llevaron a cabo a 23°C en HEPES 100 mM, pH 7,75:

1. 250 µl (aprox. 400 mg de H6Ubi-IEPD-ApoA1 + 0,4 mg de GrB-H6 C228F)
2. 250 µl (aprox. 350 mg de H6Ubi-IEGR-ApoA1 + 0,35 mg de FX_a)

Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 0, 1, 3, 6, 24 y 48 horas de incubación a 23°C, ver la figura 12.

El sustrato de GrB, H6Ubi-IEPD-ApoA1, resultó cortado aproximadamente al 100% tras sólo 6 horas de incubación a 23°C, mientras que sólo resultó cortada una fracción pequeña del sustrato de FX_a, H6Ubi-IEGR-ApoA1 tras 6 horas. También se observó que FX_a requería más de 48 horas para completar el corte del sustrato de FX_a.

En los dos ejemplos anteriores, tanto la proteasa GrB-H6 como la GrB-H6 C228F, tal como se ha indicado son superiores a FX_a, ya que cualquiera de los dos corta mucho más rápidamente (en el caso de H6Ubi-X-ApoA1) o más específicamente (en el caso de H6-X-RAP) que FX_a bovina purificada (en la que X se refiere a los sitios de reconocimiento IEPD o IEGR). Con estos dos ejemplos se demuestra que GrB-H6 y GrB-H6 C228F pueden cortar ambos una etiqueta N-terminal corta similar a la cola hexa-His (H6 en H6-IEPD-RAP) y que cortan entre los dos dominios de proteína, los cuales se encuentran estrechamente conectados mediante una secuencia conectora corta que comprende el sitio de corte de GrB contiguo al polipéptido de interés (en la presente memoria ApoA1 en H6Ubi-IEPD-ApoA1, con la secuencia conectora GGSIEPD, en la que IEPD es el sitio de reconocimiento de GrB). Se verificó que GrB-H6 y GrB-H6 C228F producían los productos correctamente cortados mediante secuenciación N-terminal en ambos casos.

Corte de H6-IEPD-TN123 por GrB-H6

La proteína de fusión H6-IEPD-TN123 (preparada tal como se indica en el Ejemplo 7) eluida de la columna de Q Sepharose se filtró en gel tras la purificación final en HEPES 100 mM, pH 7,5 y se incubaron muestras de 200 µl de la fracción superior a temperatura ambiente con 0, 1 ó 10 µl de GrB-H6 activado (aproximadamente 0, 0,2 y 2 mg de GrB-H6) tanto en presencia como en ausencia de CaCl₂ 5 mM. Se extrajeron muestras para SDS-PAGE de las incubaciones sin CaCl₂ tras 12, 19 y 24 horas, así como tras 5 días de incubación. Ver las figuras 4, 5 y 13. Se extrajeron muestras para SDS-PAGE de las incubaciones tanto con como sin CaCl₂ tras aproximadamente 20 y 48 horas de incubación, ver la figura 14.

Sin Ca²⁺:

Las muestras mostraron un patrón de bandas claro al cortar H6-IEPD-TN123 con GrB-H6 en ausencia de Ca²⁺, tal como se observa en las figuras 4, 5 y 13. El H6-IEPD-TN123 fue cortado correctamente en la secuencia IEPD, aunque también igual de rápidamente en un sitio interno de la secuencia AQPDP. Se explica el patrón de bandas en la figura 15. Puede observarse que H6-IEPD-TN123 fue cortado en el sitio IEPD↓ correcto en el carril J en la figura 4, en la que H6-FX-TN123 murino había sido cortado por FX_a, proporcionando un producto del mismo tamaño que el producto del corte con GrB-H6 de H6-IEPD-TN123 sin corte interno, es decir, la banda situada más abajo de las cuatro bandas del patrón.

Al reducir las muestras tal como en los carriles B-D y L-N en la figura 13 apareció un patrón de bandas diferente. Esta patrón se explica también en la figura 15 y apoya la noción del sitio interno de corte específico AQPDP.

Con Ca²⁺:

La figura 11 muestra incubaciones de H6-IEPD-TN123 con GrB-H6, en las que se añadió CaCl₂ 5 mM a algunas de las incubaciones. En este caso sólo aparecieron dos bandas en presencia de Ca²⁺ (carriles E y G), mientras que aparecieron cuatro bandas en ausencia de Ca²⁺, tal como se indica para las figuras 4, 5, 13 y 15. Ello demuestra que mediante la adición de Ca²⁺ a la incubación puede provocarse que el sitio interno de corte AQPDP en la tetranectina (TN123) resulte inaccesible a GrB-H6. Lo anterior se debe a que la secuencia AQPDP se encuentra situada en un bucle, en el que los residuos Q y D participan en la unión de los iones Ca²⁺ en la tetranectina. De esta manera, sólo se produce el corte correcto en el sitio específico IEPD en la proteína de fusión, y el sitio interno de corte en TN123 resulta "desactivado" por la adición de Ca²⁺.

Corte de variantes de H6-TripUB

Cada una de las proteínas de fusión eluidas de la columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa se filtró en gel en HEPES 100 mM, pH 7,4, y se utilizaron fracciones de aproximadamente igual concentración de las cinco variantes diferentes de H6-TripUB. Las cinco variantes eran H6-TripUB IEPD↓SP, H6-TripUB IQAD↓SP, H6-TripUB IQAD↓SG, H6-TripUB VGP↓SP y H6-TripUB VGP↓FG. De cada proteína de fusión, se incubaron 200 μl a temperatura ambiente, 23°C, con 5 μl de GrB-H6 activado (aproximadamente 1 mg de GrB-H6). De esta manera, la proporción de proteasa:proteína de fusión era de 1:500. Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 2, 6, 24 y 48 horas de incubación y se muestran los geles en las figuras 16 y 17.

En la figura 16 se muestran las muestras de H6-TripUB IEPD↓SP, H6-TripUB IQAD↓SP y H6-TripUB IQAD↓SG. Tras 48 horas de incubación, se había cortado correctamente aproximadamente 2/3 de la cantidad original de H6-TripUB IEPD↓SP no cortado. En comparación, el corte de la secuencia IQAD↓SP, sin embargo, fue mucho más lento que el corte de la secuencia IEPD↓SP en H6-TripUB IEPD↓SP. No era visible producto tras 2 horas de incubación y sólo se había cortado una cantidad reducida tras 48 horas de incubación. De las muestras de H6-TripUB IQAD↓SG resulta evidente que el corte era mucho más rápido que para H6-TripUB IEPD↓SP y H6-TripUB IQAD↓SP. Ya tras 2 horas de incubación se había cortado la mayor parte de la proteína de fusión, proporcionando el producto correcto. La mutación única de Pro (P) en Gly (G) en el sitio P2' en la secuencia de reconocimiento resultó suficiente para este cambio drástico en la velocidad de corte.

En la figura 17 se muestran las muestras de las incubaciones de H6-TripUB VGP↓SP y H6-TripUB VGP↓FG. El corte de la secuencia VGP↓SP fue prácticamente tan rápido como para H6-TripUB IEPD↓SP en la figura 16. Se había formado una cantidad reducida de producto tras 2 horas y aproximadamente la mitad de la proteína de fusión había sido cortada tras 48 horas. Se produjo un cambio drástico en la velocidad de reacción al cambiar los sitios P1' y P2' de SP a FG en H6-TripUB VGP↓SP. Tras sólo 2 horas de incubación se había cortado correctamente la totalidad de la proteína de fusión.

La figura 18 muestra las muestras del corte de H6-TripUB IEPD↓TQ y H6-TripUB IEPD↓IV en comparación con H6-TripUB IEPD↓SP. Los dos constructos H6-TripUB IEPD↓TQ y H6-TripUB IEPD↓IV son mutantes por delección de la parte Trip de H6-TripUB IEPD↓SP, en el que los primeros 7 residuos son delecionados en H6-TripUB IEPD↓TQ y los 13 primeros residuos son delecionados en H6-TripUB IEPD↓IV.

En este caso la proporción de proteasa:proteína de fusión también era de 1:500 y las reacciones se llevaron a cabo a 23°C. Se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 4, 24 y 96 horas de incubación.

Del gel mostrado en la figura 18 resulta evidente que el corte de tanto H6-TripUB IEPD↓TQ como H6-TripUB IEPD↓IV es mucho más rápido que para H6-TripUB IEPD↓SP. Tal como se muestra en la figura 19 siguiente, lo anterior podría deberse a la Pro en el sitio P2' de H6-TripUB IEPD↓SP.

La figura 19, panel A, muestra el corte de H6-TripUB IEPD↓SP y H6-TripUB IEPD↓EP, mientras que el panel B muestra el corte de H6-TripUB IEPD↓EP y H6-TripUB IEPD↓EG. En este caso la proporción de proteasa:proteína de fusión nuevamente es de 1:500 y las mezclas de reacción de corte se incubaron tanto a 23°C como a 37°C. Para el gel en el panel A, se extrajeron muestras para SDS-PAGE tras 0, 4, 24 y 48 horas y para el gel en el panel B tras 0, 6, 24 y 50 horas.

A partir de dichos geles resulta evidente que una Pro en el sitio P2' resulta desventajosa para la velocidad de corte por GrB-H6 C228F. Inesperadamente se observó que GrB-H6 C228F podía cortar el sustrato que contiene el sitio IEPD↓EP. Corta este sitio con la misma eficiencia baja que el sitio IEPD↓SP, aunque residuos ácidos tales como Glu (E) en el sitio P1' es conocido por eliminar el corte por parte de la mayoría de serina proteasas, por ejemplo la FX_a bovina purificada.

Considerando los sitios P1' y P2' de IEPD↓SP, IQAD↓SP, IQAD↓SG, IEPD↓EP y IEPD↓EG, se demuestra que el cambio en el sitio P2' de prolina a glicina incrementa el corte drásticamente. Esta preferencia por G en la posición P2' también fue observada por Harris J.L. et al., 1998, para GrB de rata de tipo salvaje utilizando sustratos péptidos expresados sobre partículas fágicas. Nuevamente GrB-H6 C228F muestra un corte inesperadamente efectivo del sitio IEPD↓EG a pesar de la E en P1', lo que es bien conocido de la técnica, tal como se ha indicado anteriormente, para obstruir el corte por la mayoría de serina proteasas. A una proporción de proteasa a sustrato de 1:500 se tardan menos de 5 horas para que GrB-H6 C228F complete el corte de H6-TripUB IEPD↓EG. A este respecto, GrB-H6 C228F nuevamente resulta superior a FX_a.

Además de estas observaciones también resulta importante indicar que incluso tras 48 horas de incubación con GrB-H6 o GrB-H6 C228F, no tiene lugar corte interno en ninguna de las variantes de H6-TripUB, demostrando que

GrB-H6 y GrB-H6 C228F corta muy específicamente en los sitios de reconocimiento manipulados, aunque la secuencia TripUB contiene 7 otros residuos Asp (D).

Ejemplo 9

Inmovilización de granzima B

Con el fin de eliminar fácilmente el enzima granzima B de la mezcla de corte, se utilizó la variante GrB-H6 C228F para la inmovilización sobre una matriz de gel en seis experimentos, tal como se describe a continuación.

La inmovilización se llevó a cabo en NaHCO_3 0,3 M/ NaOH , pH 8,6, utilizando la matriz de divinilsulfona activada denominada Mini-Leak (Kem-En-Tec). Se utilizaron dos niveles de activación: 2 a 5 milimoles y 10 a 50 milimoles de grupos vinilo por litro de perlas sedimentadas, respectivamente, y para cada nivel de activación, se llevaron a cabo tres experimentos con diferente concentración de proteína y en presencia o en ausencia de PEG 20000. Se resumen los seis experimentos en la Tabla 10. Para la inmovilización se utilizó GrB-H6 C228F en NaHCO_3 0,3 M/ NaOH , pH 8,6, a una concentración de proteína de 4 mg/ml, estimada en un ensayo de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar de proteína. Se midió la actividad enzimática de la solución de GrBH6 C228F tal como se describe en el Ejemplo 4 utilizando los tampones NaHCO_3 0,3 M/ NaOH , pH 8,6 y PEG 20000 al 30%; NaHCO_3 0,3 M como tampones de ensayo. La inmovilización se llevó a cabo mezclando el gel drenado, solución de proteína, y tampones, proporcionando los volúmenes y concentraciones indicadas en la Tabla 10, seguido de la mezcla a temperatura ambiente durante 48 horas.

Tabla 10:

Experimento	Nivel de activación (mM)	Concentración de proteína (mg/ml)	% de PEG 20000	Eficiencia (%)
A	2-5	0,75	0	10
B	2-5	0,75	9	18
C	2-5	2	0	10
D	10-50	0,75	0	16
E	10-50	0,75	9	10
F	10-50	2	0	10

El exceso de grupos activos se bloqueó mediante la adición de 600 μl de etanolamina 0,2 M, pH 9,0, tras drenar el gel mediante centrifugación y eliminar el sobrenadante, seguido de la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavado del gel tres veces con NaCl 1 M (centrifugación seguido de eliminación del sobrenadante) y finalmente el gel se lavó con NaCl 250 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 8,0. La actividad enzimática de GrBH6 C228F inmovilizado se estimó pesando la matriz de gel drenada, mezclando con 300 μl de una solución de sustrato que contenía HEPES 100 mM, pH 7,75, Ac-IEPD-pNa 400 mM (Calbiochem) y midiendo después la $\text{DO}_{405 \text{ nm}}$ del sobrenadante tras un determinado tiempo de incubación para determinar el $\Delta\text{DO}_{405 \text{ nm}}/\text{min}$ por μl de solución de sustrato por g de gel drenado. Se utilizó la actividad enzimática de GrB-H6 C228F inmovilizado para determinar la eficiencia de acoplamiento en porcentaje de la actividad enzimática calculada en el caso de que la totalidad del enzima aplicado se hubiese acoplado y estuviese activo.

También se indica en la Tabla 10 la eficiencia de acoplamiento, y no se observó diferencia significativa en la eficiencia de acoplamiento entre los dos niveles de activación y la eficiencia también era del mismo orden para las dos concentraciones de proteínas, de manera que el nivel de acoplamiento más alto se obtuvo al utilizar una concentración de proteína elevada en la mezcla de inmovilización. No puede deducirse si la adición de PEG 20000 a la mezcla de acoplamiento resulta favorable para la inmovilización y no se evaluó para la concentración de proteína elevada.

Se determinó la estabilidad de GrB-H6 C228F inmovilizado frente a la desnaturalización con urea y cloruro de guanidinio (GdmCl) para las dos inmovilizaciones con concentración de proteína elevada (experimentos C y F). Cada una de las matrices de gel de los experimentos C y F se dividieron en alícuotas en tres pequeñas columnas de centrifugación y se incubaron con urea 8M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (Urea), con cloruro de guanidinio 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8 (GdmCl) o con HEPES 100 mM, pH 7,75 (HEPES), durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de lavarlos y equilibrarlos en HEPES 100 mM, pH 7,75. A continuación, se determinó la actividad enzimática de GrB-H6 C228F inmovilizado tal como se ha indicado anteriormente.

Se muestran a continuación, en la Tabla 11, las actividades enzimática obtenidas. La desnaturalización con urea aparentemente resulta favorable para GrB-H6 C228F inmovilizado, ya que se incrementa la actividad enzimática tras la incubación en comparación con la incubación con el tampón HEPES no desnaturalizante, mientras que la desnaturalización con cloruro de guanidinio aparentemente presenta un efecto de ligera reducción de la actividad

enzimática.

Tabla 11:

Experimento	Tampón	Actividad enzimática ^a
C	Urea	99
	GdmCl	89
	HEPES	91
F	Urea	104
	GdmCl	78
	HEPES	90
^a Δ DO405/min por ml de solución de sustrato por g de gel drenado		

- 5 Se demostró la funcionalidad de GrB-H6 C228F inmovilizado mediante el corte de las proteínas de fusión H6-TRipUB IQAD↓SP y H6-TripUB IQAD↓SG tal como se describe en el Ejemplo 6. Los experimentos de corte se llevaron a cabo con 50 μ l de cada matriz de gel procedente de los seis experimentos de inmovilización. La matriz de gel se resuspendió en 200 μ l de un tampón que contenía HEPES 100 mM, pH 7,75, y se incubó con 100 μ l de solución de proteína de cada una de las dos proteínas de fusión a temperatura ambiente durante la noche bajo
- 10 agitación. Se extrajeron muestras del sobrenadante y se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora; ver la figura 20.

- Se cortó la totalidad de las proteínas de fusión en los doce experimentos de corte, proporcionando un único producto correspondiente a la fracción TripUbi a partir de la cual se escindió la pareja de fusión H6. Tal como se esperaba, se
- 15 cortó ligeramente más proteína de fusión de las matrices de gel de los experimentos C y F que deberían presentar los niveles de acoplamiento más altos. No se evaluó la eficiencia de corte.

Referencias

- 20 Christensen J.H. et al. (1991), FEBS Letters, 281(1-2): 181-184.
 Nykjær A. et al. (1992), Journal of Biological Chemistry, 267(21): 14543-14548.
 Holtet T.L. et al. (1997), Protein Science, 6: 1511-1515
 Studier F.W. et al. (1990), Methods in Enzymology, 185: 60-89
 Hochuli E. et al. (1988), Biotechnology, 1321-1325
- 25 Harris et al. (1998), Journal of Biological Chemistry 273(42): 27364-27373.
 Casciola-Rosen et al. (1999), Journal of Experimental Medicine 190(6): 815-825.
 Thøgersen et al. (1994), International Patent Application WO 9418227
 Sun J. et al. (2001), Journal of Biological Chemistry 276(18): 15177-15184.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Borean Pharma A/S
 <120> Corte de proteínas de fusión utilizando la proteasa granzima B
 <130> 3106
- 10 <160> 57
 <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> pro-IEGR-GrB-H6
 <400> 1

Met Gly Ser Ile Glu Gly Arg Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15
His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30
Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45
Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60
Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80
Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95
Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110
Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125
Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160
Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175
Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190
Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205
Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220
His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240
His His His

<210> 2
<211> 243
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> pro-IEPD-GrB-H6

5

<400> 2

```

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1      5      10      15
His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20     25     30
Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35     40     45
Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50     55     60
Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65     70     75     80
Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85     90     95
Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100    105    110
Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115    120    125
Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130    135    140
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145    150    155    160
Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165    170    175
Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180    185    190

```

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 3

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> pro-IEAD-GrB-H6

10

<400> 3

Met Gly Ser Ile Glu Ala Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15
His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30
Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45
Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60
Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80
Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95
Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110
Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125
Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160
Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175
Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190
Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205
Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Cys Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220
His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240
His His His

<210> 4
<211> 243
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228S

<400> 4

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175

Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Ser Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 5
<211> 243

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> pro-IEPD-GrB-H6 C228A

<400> 5

```

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
 1          5          10          15

His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
          20          25          30

Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
          35          40          45

Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
 50          55          60

Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
 65          70          75          80

Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
          85          90          95

Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
          100          105          110

Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
          115          120          125

Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
          130          135          140

His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
 145          150          155          160

Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
          165          170          175

```


Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190

Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205

Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Ala Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220

His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 6
<211> 243
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> pro-IEPD-GrB-H6 C228T

<400> 6

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15
His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30
Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45
Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60
Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80
Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95
Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110
Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125
Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160
Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175
Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190
Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205
Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Thr Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220
His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240
His His His

5 <210> 7
<211> 243

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
 <223> pro-IEPD-GrB-H6 C228V

<400> 7

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
1 5 10 15
His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
20 25 30
Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
35 40 45
Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
50 55 60
Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
65 70 75 80
Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
85 90 95
Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
100 105 110
Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
115 120 125
Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
130 135 140
His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
145 150 155 160
Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
165 170 175
Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
180 185 190
Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
195 200 205
Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Val Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
210 215 220
His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
225 230 235 240
His His His

<210> 8
<211> 243
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> pro-IEPD-GrB-H6 C228F

5

<400> 8

Met Gly Ser Ile Glu Pro Asp Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro
 1 5 10 15
 His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser
 20 25 30
 Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr
 35 40 45
 Ala Ala His Cys Trp Gly Ser Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His
 50 55 60
 Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg
 65 70 75 80
 Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile
 85 90 95
 Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln
 100 105 110
 Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr
 115 120 125
 Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser
 130 135 140
 His Thr Leu Gln Glu Val Lys Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys
 145 150 155 160
 Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val
 165 170 175
 Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 180 185 190
 Pro Leu Val Cys Asn Lys Val Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg
 195 200 205
 Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg Ala Phe Thr Lys Val Ser Ser Phe Val
 210 215 220
 His Trp Ile Lys Lys Thr Met Lys Arg Tyr Leu Asn Ser His His His
 225 230 235 240
 His His His

<210> 9
 <211> 46

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> H6 C-term fw

 <400> 9
 catggacgga agcttgaatt cacatcacca tcacatcac taacgc

 10 <210> 10
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> H6 C-term rev

 <400> 10
 aattgcgtta gtgatggga tggatgatg aattcaagct tccgct 46
 20
 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador GrBfw

 <400> 11
 30 catgggatcc atcgaggga ggatcatcgg gggacatgag 40

 <210> 12
 <211> 38
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador GrBrev EcoRI

 <400> 12
 40 gcgtgaattc aggtaccgtt tcatggttt ctttatcc 38

 <210> 13
 <211> 715
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> GrB EcoRI fragment
 50
 <400> 13

```

catgggatcc atcgagggta ggatcatcgg gggacatgag gccaagcccc actccccgcc 60
ctacatggct tatcttatga tctgggatca gaagtctctg aagaggtgcg gtggcttcct 120
gatacaagac gacttcgtgc tgacagctgc tcaactgttg ggaagctcca taaatgtcac 180
cttggggggcc cacaatatca aagaacagga gccgacccag cagtttatcc ctgtgaaaag 240
acccatcccc catccagcct ataatcctaa gaacttctcc aacgacatca tgctactgca 300
gctggagaga aaggccaagc ggaccagagc tgtgcagccc ctgaggctac ctagcaacaa 360
ggcccagggtg aagccagggc agacatgcag tgtggccggc tgggggcaga cggccccct 420
gggaaaacac tcacacacac tacaagaggt gaagatgaca gtgcaggaag atcgaaagtg 480
cgaatctgac ttacgccatt attacgacag taccattgag ttgtgcgtgg gggaccacaga 540
gattaaaaag acttccttta agggggactc tggaggccct cttgtgtgta acaagggtggc 600
ccagggcatt gtctcctatg gacgaaacaa tggcatgcct ccacgagcct gcaccaaagt 660
ctcaagcttt gtacactgga taaagaaaac catgaaacgg tacctgaatt cacgc 715

```

```

5  <210> 14
    <211> 33
    <212> ADN
    <213> Artificial

10  <220>
    <223> GrB GR-PD fw

    <400> 14
    tccatcgagc cggatatcat cgggggacat gag 33

15  <210> 15
    <211> 34
    <212> ADN
    <213> Artificial

20  <220>
    <223> GrB GR-PD rev

    <400> 15
    cccgatgat atccggctcg atggatccca tatg 34

25  <210> 16
    <211> 33
    <212> ADN
    <213> Artificial

30  <220>
    <223> GrB GR-AD fw

    <400> 16
    tccatcgagg ctgatatcat cgggggacat gag 33

35  <210> 17
    <211> 34
    <212> ADN
    <213> Artificial

40  <220>

```


<223> GrB GR-AD rev
 <400> 17
 5 ccccgatgat atcagcctcg atggatccca tatg 34
 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> GrB SAT fw
 <400> 18
 15 tccacgagca dccaccaaag tctcaag 27
 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> GrB SAT rev
 25 <400> 19
 agactttggt gghggctcgt ggaggc 26
 <210> 20
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> GrB VF fw
 35 <400> 20
 tccacgagcc ktcaccaaag tctcaag 27
 <210> 21
 40 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> GrB VF rev
 <400> 21
 agactttggt gamggctcgt ggaggc 26
 50 <210> 22
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> H6-TripUB IEPD!SP
 <400> 22

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

<210> 23
<211> 338
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> H6-IEPD-RAP
<400> 23

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ile Glu Pro Asp Tyr
1 5 10 15
Ser Arg Glu Lys Asn Gln Pro Lys Pro Ser Pro Lys Arg Glu Ser Gly
20 25 30
Glu Glu Phe Arg Met Glu Lys Leu Asn Gln Leu Trp Glu Lys Ala Gln
35 40 45
Arg Leu His Leu Pro Pro Val Arg Leu Ala Glu Leu His Ala Asp Leu
50 55 60
Lys Ile Gln Glu Arg Asp Glu Leu Ala Trp Lys Lys Leu Lys Leu Asp
65 70 75 80
Gly Leu Asp Glu Asp Gly Glu Lys Glu Ala Arg Leu Ile Arg Asn Leu
85 90 95

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

<210> 24
 <211> 336
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> H6ubi-IEPD-ApoA1

5

<400> 24

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr
 20 25 30
 Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro
 35 40 45
 Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg
 50 55 60
 Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Ile Glu Pro Asp Gly Gly Asp Glu Pro
 85 90 95
 Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val
 100 105 110
 Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly
 115 120 125
 Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp
 130 135 140
 Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val
 145 150 155
 Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg
 165 170 175
 Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro
 180 185 190
 Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr
 195 200 205
 Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg
 210 215 220
 Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu
 245 250 255
 Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu
 260 265 270

Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys
275 280 285

Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu
290 295 300

Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val
305 310 315 320

Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln
325 330 335

<210> 25

<211> 197

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> H6-IEPD-TN123

10

<400> 25

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Ile Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15
Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp
20 25 30
Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr
35 40 45
Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr
50 55 60
Val Cys Leu Lys Gly Thr Lys Val His Met Lys Cys Phe Leu Ala Phe
65 70 75 80
Thr Gln Thr Lys Thr Phe His Glu Ala Ser Glu Asp Cys Ile Ser Arg
85 90 95
Gly Gly Thr Leu Ser Thr Pro Gln Thr Gly Ser Glu Asn Asp Ala Leu
100 105 110
Tyr Glu Tyr Leu Arg Gln Ser Val Gly Asn Glu Ala Glu Ile Trp Leu
115 120 125
Gly Leu Asn Asp Met Ala Ala Glu Gly Thr Trp Val Asp Met Thr Gly
130 135 140
Ala Arg Ile Ala Tyr Lys Asn Trp Glu Thr Glu Ile Thr Ala Gln Pro
145 150 155 160
Asp Gly Gly Lys Thr Glu Asn Cys Ala Val Leu Ser Gly Ala Ala Asn
165 170 175
Gly Lys Trp Phe Asp Lys Arg Cys Arg Asp Gln Leu Pro Tyr Ile Cys
180 185 190

Gln Phe Gly Ile Val
195

<210> 26
<211> 150
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> H6-TripUB IQADISP

10 <400> 26

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

<210> 27
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> H6-TripUB IQAD!SG

<400> 27

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15
Gln Ala Asp Ser Gly Gly Thr Glu Pro Pro Thr Gln Lys Pro Lys Lys
20 25 30

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
35 40 45

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Gly Ser Gln Ile Phe Val Lys Thr
65 70 75 80

Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile
85 90 95

Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr
115 120 125

Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu
130 135 140

Arg Leu Arg Gly Gly Ser
145 150

<210> 28
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> H6-TripUB VGPD!SP

<400> 28

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

<210> 29
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> H6-TripUB VGPD!FG

<400> 29

ES 2 427 974 T3

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

<210> 30
<211> 143
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> H6-TripUB IEPD!TQ

<400> 30

ES 2 427 974 T3

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

<210> 31
<211> 137
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> H6-TripuB IEPD!IV

<400> 31

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

<210> 32
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> H6-TripUB IEPD!EP

<400> 32

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

<210> 33
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> H6-TripUB IEPDIEG

<400> 33

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ile
1 5 10 15

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

- 5 <210> 34
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> cebador TripUB GrB fw

 15 <400> 34
 gtggatccat cgagcctgac tctcctggta ccgagcc 37

 20 <210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> cebador TripUB GrB rev

 30 <400> 35
 ggtaccagga gattcaggct cgtatggatcc actaccac 38

 35 <210> 36
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador RAP GrB fw

<400> 36
 cggatccatc gagcctgact actcgcgga gaag 34
 5 <210> 37
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador RAP GrB rev
 <400> 37
 cccgcgagta gtcaggctcg atggatccgt gatg 34
 15 <210> 38
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Mut-GrB fw
 <400> 38
 cgtggtgat ccatcgagcc ggacggtgga gatgaacccc cc 42
 25 <210> 39
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Mut-GrB rw
 <400> 39
 35 ggggggttca tctccaccgt ccggctcgat ggatccacca cg 42
 <210> 40
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador TN GrB fw
 45 <400> 40
 ggatccatcg agcctgacgg cgagccacca acc 33
 <210> 41
 <211> 33
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador TN GrB rev
 55 <400> 41
 ggctcgccgt caggctcgat ggatccgtga tgg 33
 <210> 42
 60 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> PC7TripUB GR-AD fw

 <400> 42
 5 ggatccatcc aggcagactc tcctggtacc gag 33

 <210> 43
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> PC7TripUB GR-AD rev

 15 <400> 43
 gtaccaggag agtctgcctg gatggatcca ctac 34

 <210> 44
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> PC7TripUB P-G fw
 25 <400> 44
 ggatccatcc aggcagactc tgggtggtacc gagccac 37

 <210> 45
 30 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> PC7TripUB P-G rev

 <400> 45
 ctcggtacca ccagagtctg cctggatgga tccactac 38

 40 <210> 46
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> DNATrip IE-VG fw

 <400> 46
 50 gtagtggatc agtcgggcct gactctcctg gtac 34

 <210> 47
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> DNATrip IE-VG rev

 <400> 47
 60 gagagtcagg cccgactgat ccactaccac tacc 34

 <210> 48
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> DNATrip SP-FG fw

 <400> 48
 ggcttgactt tgggtgtacc gagccaccaa c 31

 10 <210> 49
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> DNATrip SP-FG rev

 <400> 49
 20 ggctcggtag caccaaagtc aggcccgact g 31

 <210> 50
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Trip IEPD-TQ

 <400> 50
 30 gggaaaggat ccatcgagcc tgacaccag aagccaaga agattgttaa tg 52

 <210> 51
 <211> 54
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Trip IEPD-IV

 <400> 51
 40 gggaaaggat ccatcgagcc tgacattgta aatgccaaga aagattgtgt gaac 54

 <210> 52
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> UB3

 50 <400> 52
 cgcaagcttg catgcttagg atccaccag aagtctcaa 39

 <210> 53
 55 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> TripUB EP fw

 <400> 53
 cgagcctgac gagcctgta ccgagccac 29

5 <210> 54
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> TripUB EP rev

 10 <400> 54
 cgtaccagg ctcgtcaggc tcgatggatc 30

 <210> 55
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> TripUB EG fw
 20 <400> 55
 cctgacgagg gtggtaccga gccaccaac 29

 <210> 56
 25 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> TripUB EG rev

 <400> 56
 gctcgggtacc accctcgtca ggctcgatg 29

 35 <210> 57
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> GrB variante C228F

 <400> 57

Ile Ile Gly Gly His Glu Ala Lys Pro His Ser Arg Pro Tyr Met Ala
1 5 10 15
Tyr Leu Met Ile Trp Asp Gln Lys Ser Leu Lys Arg Cys Gly Gly Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Asp Asp Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Trp Gly Ser
35 40 45
Ser Ile Asn Val Thr Leu Gly Ala His Asn Ile Lys Glu Gln Glu Pro
50 55 60
Thr Gln Gln Phe Ile Pro Val Lys Arg Pro Ile Pro His Pro Ala Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Lys Asn Phe Ser Asn Asp Ile Met Leu Leu Gln Leu Glu Arg
85 90 95
Lys Ala Lys Arg Thr Arg Ala Val Gln Pro Leu Arg Leu Pro Ser Asn
100 105 110
Lys Ala Gln Val Lys Pro Gly Gln Thr Cys Ser Val Ala Gly Trp Gly
115 120 125
Gln Thr Ala Pro Leu Gly Lys His Ser His Thr Leu Gln Glu Val Lys
130 135 140
Met Thr Val Gln Glu Asp Arg Lys Cys Glu Ser Asp Leu Arg His Tyr
145 150 155 160
Tyr Asp Ser Thr Ile Glu Leu Cys Val Gly Asp Pro Glu Ile Lys Lys
165 170 175
Thr Ser Phe Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Lys Val
180 185 190
Ala Gln Gly Ile Val Ser Tyr Gly Arg Asn Asn Gly Met Pro Pro Arg
195 200 205
Ala Phe Thr Lys Val Ser Ser Phe Val His Trp Ile Lys Lys Thr Met
210 215 220
Lys Arg Tyr
225

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de un polipéptido de interés en forma auténtica, comprendiendo dicho método las etapas de:

(i) proporcionar una proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, (a) una pareja de fusión, (b) un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte de proteasa granzima B, en el que el sitio de reconocimiento presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de ICPD↓, ISAD↓, ISSD↓, ITPD↓, VAPD↓, VATD↓, VCTD↓, VDPD↓, VDSD↓, VGPD↓, VRPD↓, VTPD↓, LEED↓, LEID↓, LGND↓, LGPD↓, AQPD↓, y en el que:

↓ es el sitio de corte para dicha proteasa granzima B, o en el que el sitio de reconocimiento presenta la fórmula general:



en la que P4 es el aminoácido I o V P3 es el aminoácido E, Q o M P2 es X, en donde X se refiere a cualquier aminoácido, P1 es el aminoácido D, y ↓ es el sitio de corte para dicha proteasa granzima B, y (c) un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés, y

(ii) poner en contacto dicha proteína de fusión con la proteasa granzima B para cortarla en dicho sitio de corte, rindiendo dicho polipéptido de interés en forma auténtica.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la formula general comprende además los aminoácidos P1' y P2', resultando en la fórmula general:

P4 P3 P2 P1↓P1'P2', en la que P1' es X, en donde X se refiere a cualquier aminoácido, P2' es G y en donde P1' y P2' son una parte del polipéptido de interés.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la formula general comprende además los aminoácidos P1', P2', P3' y P4', resultando en la fórmula general P4 P3 P2 P1↓P1'P2'P3'P4', en la que P4' es D o E, y en la que P1', P2', P3' y P4' son una parte del polipéptido de interés.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de interés se selecciona de entre el grupo que consiste de un enzima, una hormona polipeptídica, un fragmento de región variable de anticuerpo de cadena sencilla y apolipoproteína A.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la hormona polipeptídica se selecciona de entre el grupo que consiste de somatotropina, glucagón, insulina e interferón.

6. Método según la reivindicación 4, en el que dicho enzima es granzima B.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la pareja de fusión es una etiqueta de afinidad.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la etiqueta de afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste de una etiqueta polihistidina, una etiqueta poliarginina, una etiqueta FLAG, una etiqueta Strep, una etiqueta c-myc, una etiqueta S, un péptido de unión a calmodulina, un péptido de unión a celulosa, un dominio de unión a quitina, una etiqueta glutatión-S-transferasa o una proteína de unión a maltosa.

9. Método según la reivindicación 1, en el que la proteasa granzima B se selecciona de entre el grupo que consiste de la proteasa granzima B humana, la proteasa granzima B de ratón y la proteasa granzima B de rata.

10. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteasa granzima B se encuentra en una forma inmovilizada.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha proteasa granzima B se encuentra mediante el extremo C-terminal.

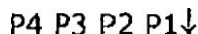
12. Método según la reivindicación 10, en el que la proteasa granzima B se encuentra inmovilizada mediante un residuo aminoácido lisina.

13. Método según la reivindicación 8, en el que la etiqueta de afinidad es una etiqueta polihistidina, y en el que la proteína de fusión se pone en contacto con proteasa granzima B en presencia de iones Ni^{2+} y de ácido nitrilotriacético (NTA).

14. Método según la reivindicación 13, en el que la concentración de Ni^{2+} se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 y 20 mM y la concentración de NTA se encuentra comprendida en el intervalo de entre 1 y 20

mM.

15. Proteína de fusión que comprende, de extremo N-terminal a C-terminal, (a) una pareja de fusión, (b) un sitio de reconocimiento de proteasa granzima B que comprende un sitio de corte, en el que el sitio de reconocimiento presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de ICPD↓, ISAD↓, ISSD↓, ITPD↓, VAPD↓, VATD↓, VCTD↓, VDPD↓, VDSD↓, VGPD↓, VRPD↓, VTPD↓, LEED↓, LEID↓, LGND↓, LGPD↓, AQPD↓, y en el que ↓ es el sitio de corte para dicha proteasa granzima B, o en el que el sitio de reconocimiento presenta la fórmula general:



en la que: P4 es el aminoácido I o V, P3 es el aminoácido E, Q o M, P2 es X, en donde X se refiere a cualquier aminoácido, P1 es el aminoácido D, y

↓ es el sitio de corte para dicha proteasa granzima B, y (c) un polipéptido de interés, en el que dicho sitio de corte es contiguo al polipéptido de interés.

16. Proteína de fusión según la reivindicación 15, en la que la fórmula general comprende además los aminoácidos P1' y P2', resultando en la fórmula general P4 P3 P2 P1↓P1'P2', en la que P1' es X, en donde X se refiere a cualquier aminoácido, P2' es G, y en la que P1' y P2' son una parte del polipéptido de interés.

17. Proteína de fusión según la reivindicación 15, en la que la fórmula general comprende además los aminoácidos P1', P2', P3' y P4', resultando en la fórmula general P4 P3 P2 P1↓P1'P2'P3'P4', en la que P4' es D o E, y en la que P1', P2', P3' y P4' son una parte del polipéptido de interés.

18. Proteína de fusión según la reivindicación 15, en la que el polipéptido de interés se selecciona de entre el grupo que consiste de un enzima, una hormona polipeptídica, un fragmento de región variable de anticuerpo de cadena sencilla y apolipoproteína A.

19. Proteína de fusión según la reivindicación 18, en la que la hormona polipeptídica se selecciona de entre el grupo que consiste de somatotropina, glucagón, insulina e interferón.

20. Proteína de fusión según la reivindicación 18, en la que dicho enzima es granzima B.

21. Proteína de fusión según la reivindicación 20, en la que dicho granzima B comprende una etiqueta polihistidina C-terminal.

22. Proteína de fusión según la reivindicación 20, seleccionada de entre el grupo que consiste de pro-IEPD-GrB-H6 (SEC ID nº 2) y pro-IEAD-GrB-H6 (SEC ID nº 3).

23. Proteína de fusión según la reivindicación 20, seleccionada de entre el grupo que consiste de pro-IEPD-GrB-H6 C228A (SEC ID nº 5), pro-IEPD-GrB-H6 C228T (SEC ID nº 6), pro-IEPD-GrB-H6 C228V (SEC ID nº 7) y pro-IEPD-GrB-H6 C228F (SEC ID nº 8).

24. Proteína de fusión según la reivindicación 15, en la que la pareja de fusión es una etiqueta de afinidad.

25. Proteína de fusión según la reivindicación 24, en el que la etiqueta de afinidad se selecciona de entre el grupo que consiste de una etiqueta polihistidina, una etiqueta poliarginina, una etiqueta FLAG, una etiqueta Strep, una etiqueta c-myc, una etiqueta S, un péptido de unión a calmodulina, un péptido de unión a celulosa, un dominio de unión a quitina, una etiqueta glutatión-S-transferasa y una proteína de unión a maltosa.

26. Secuencia de ácidos nucleicos aislada codificante de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25.

27. Vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 26.

28. Célula huésped transformada con un vector según la reivindicación 27.

29. Método para la producción de una proteína de fusión según la reivindicación 15, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar un vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 26 ligada operablemente a un promotor,

(ii) transformar una célula huésped con dicho vector recombinante,

(iii) cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permitan expresar dicha proteína de fusión, y

(iv) opcionalmente aislar dicha proteína de fusión.

Figura 1

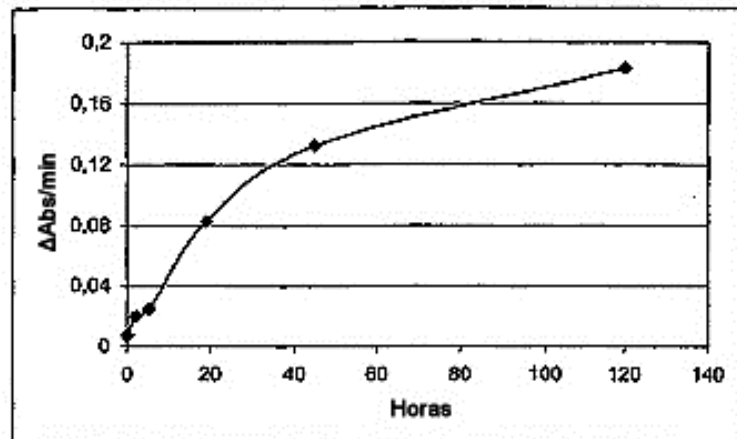


Figura 2

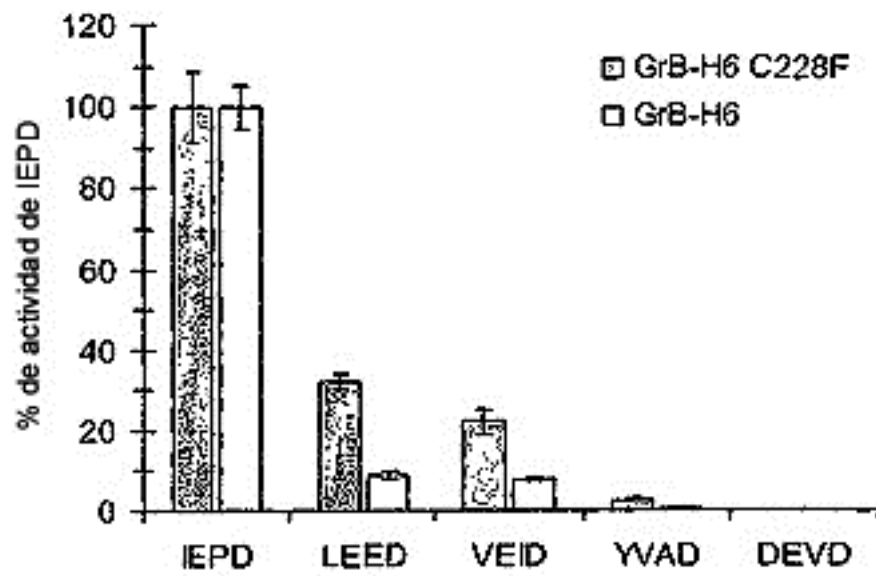


Figura 3

(A)



(B)

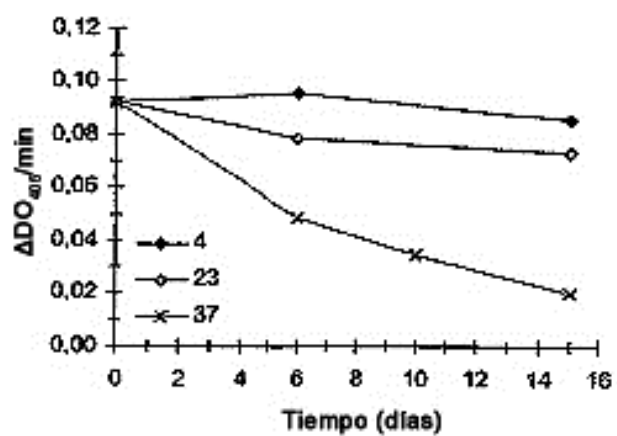


Figura 4

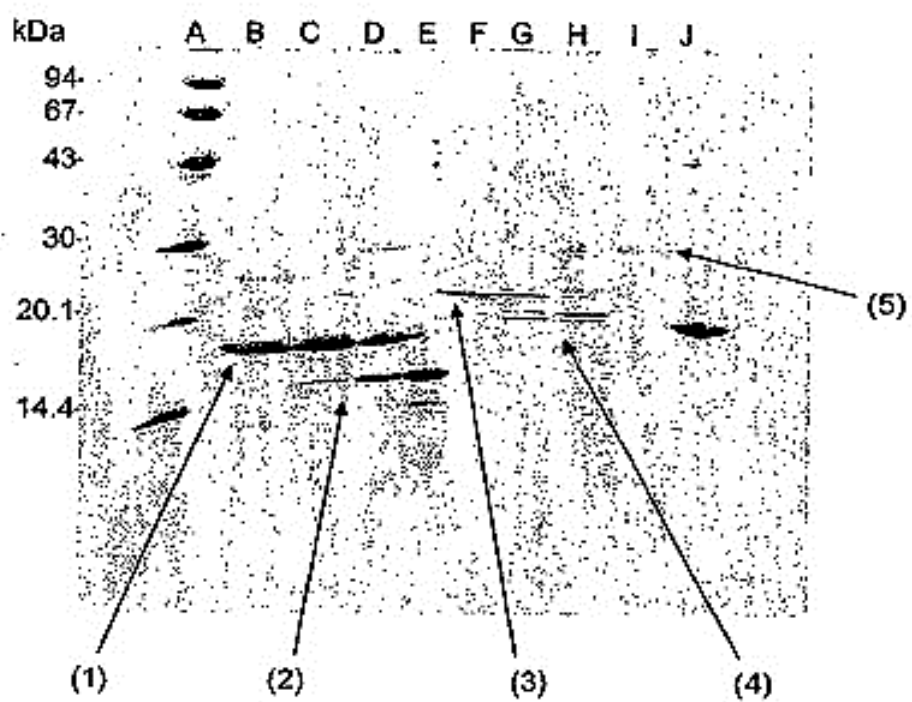


Figura 5

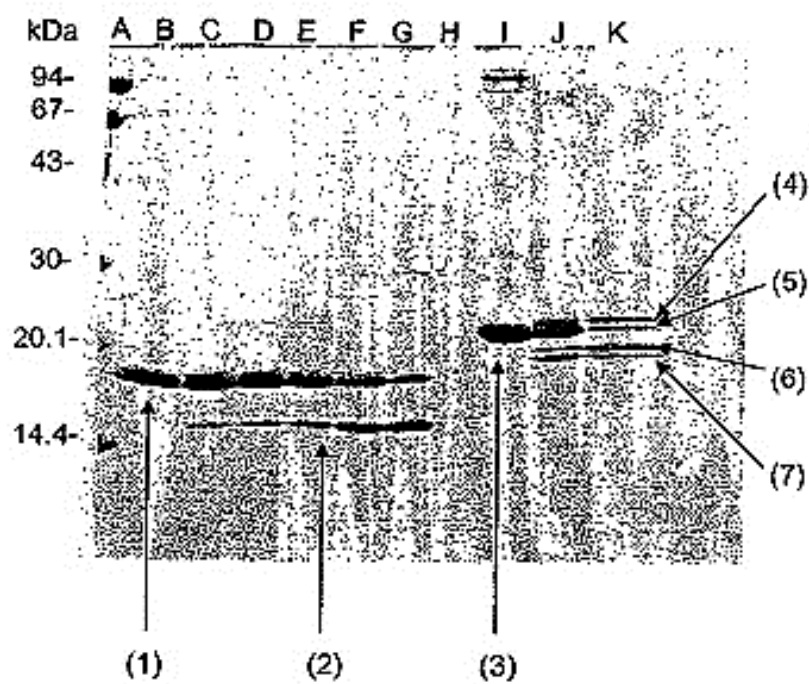


Figura 6

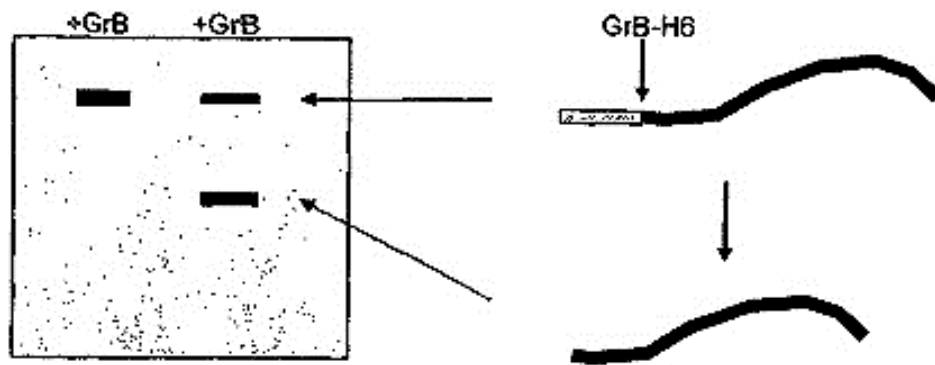


Figura 7

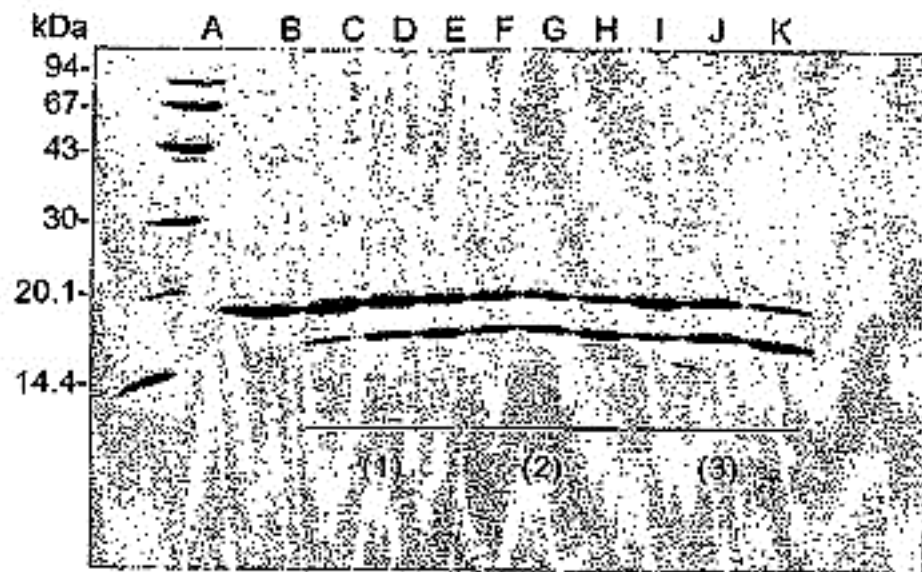


Figura 8



Figura 9

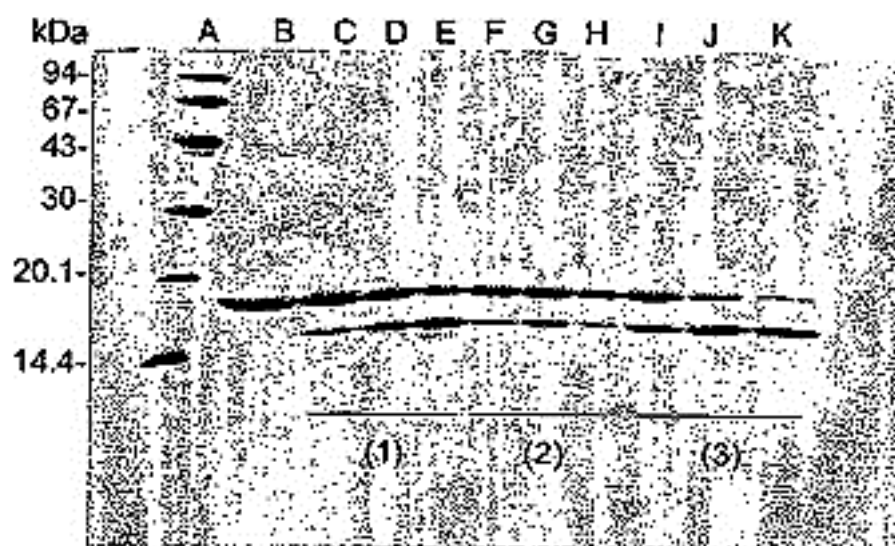


Figura 10

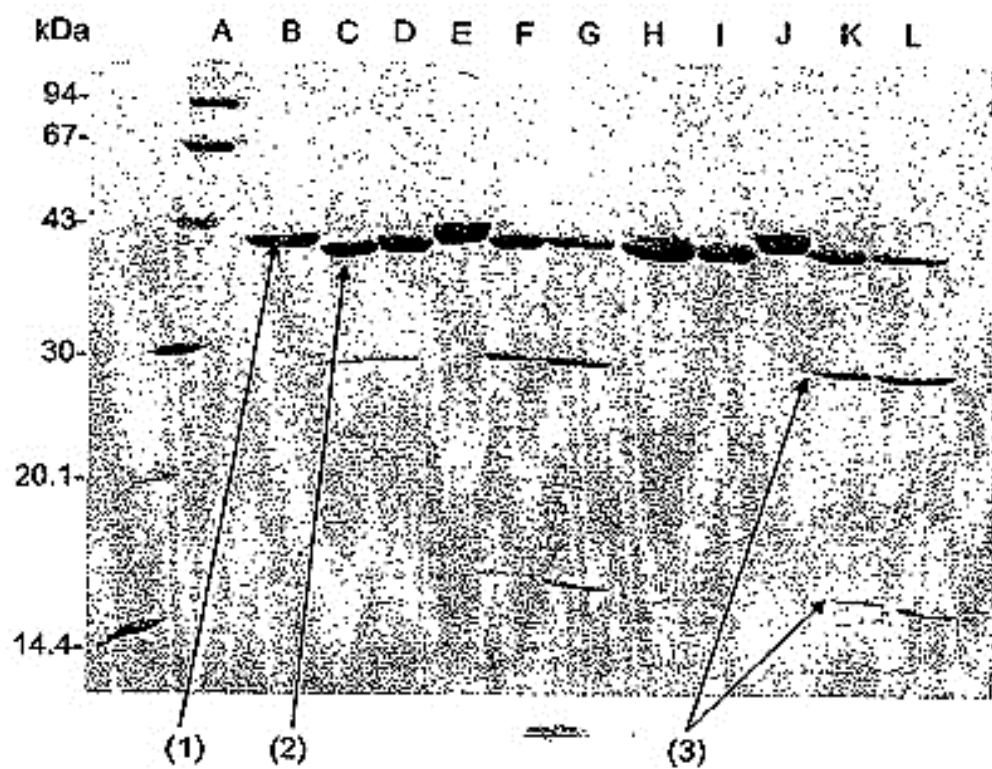


Figura 11

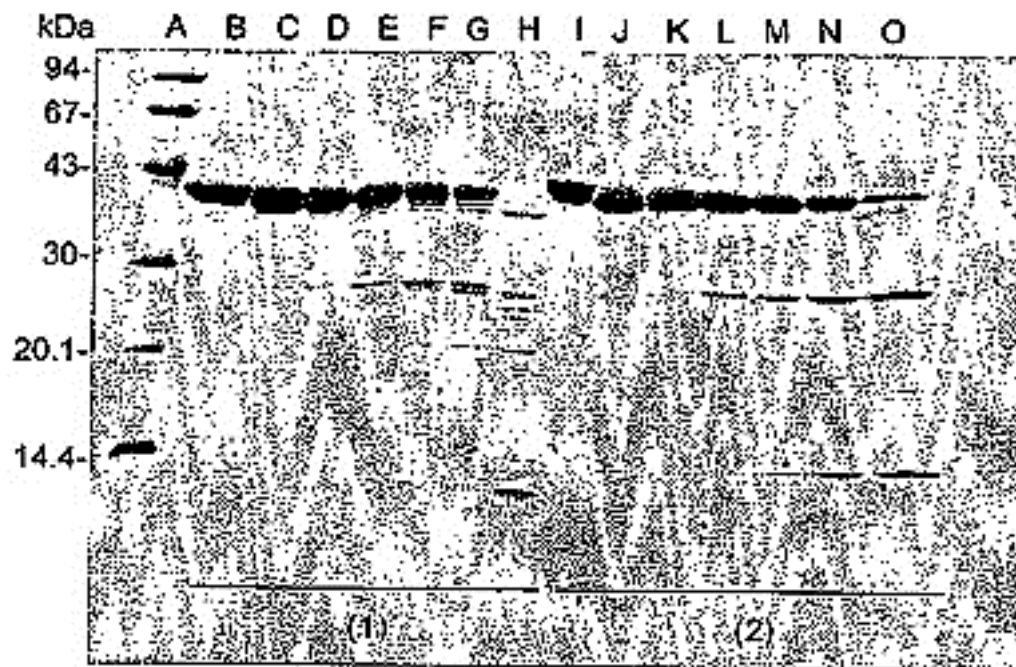


Figura 12

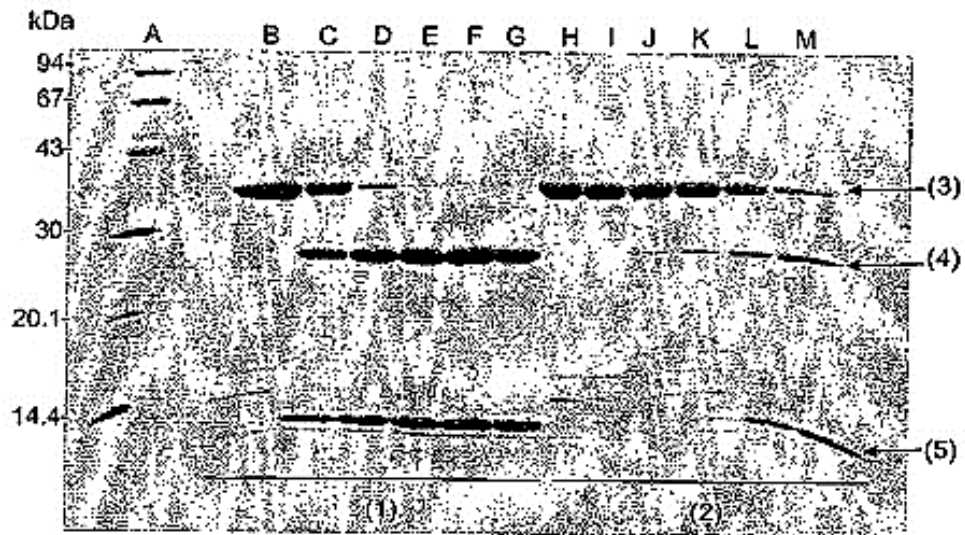


Figura 13

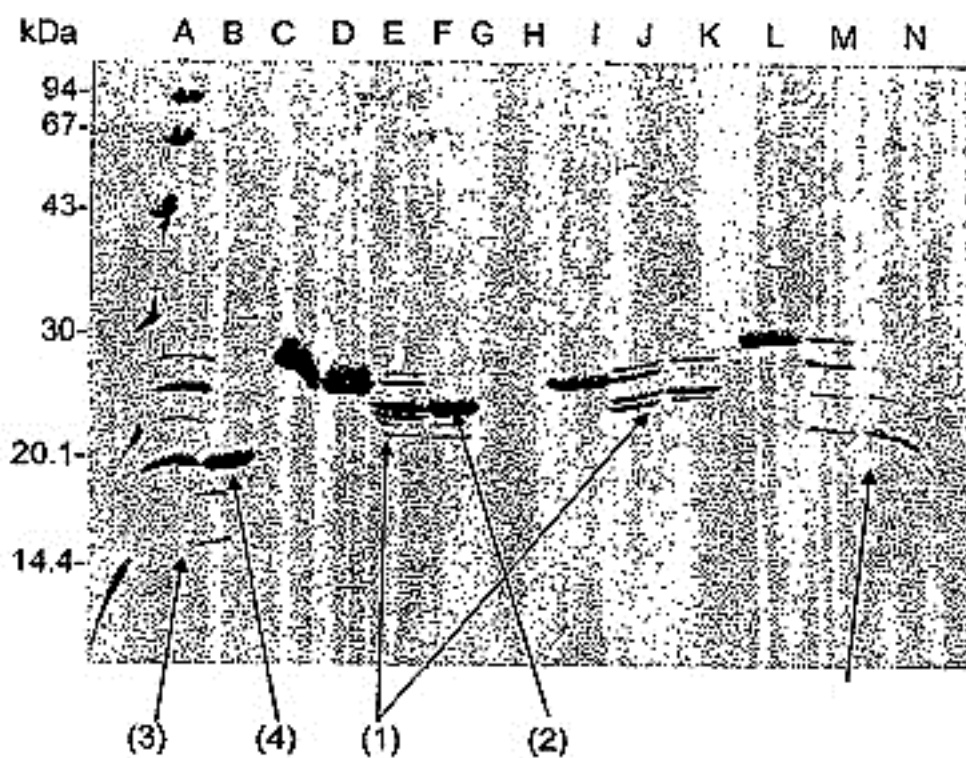


Figura 14

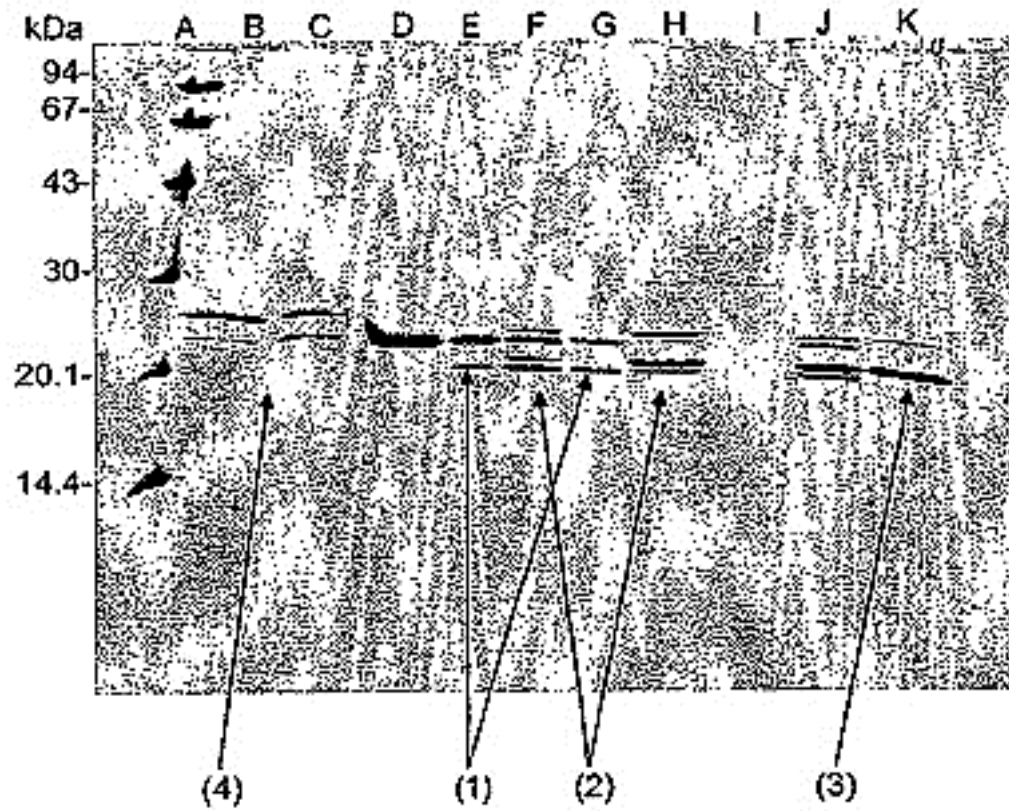


Figura 15

(A)

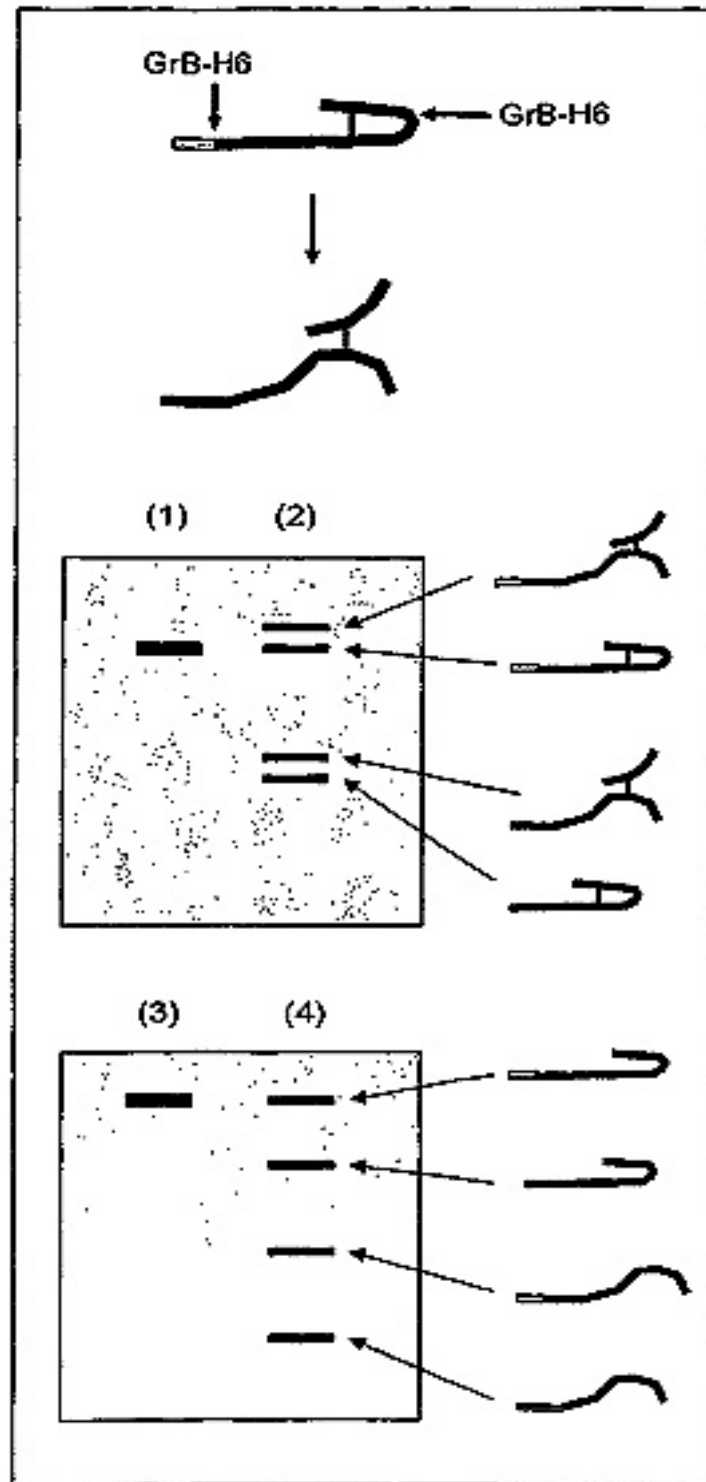


Figura 15 (continuación)

(B)

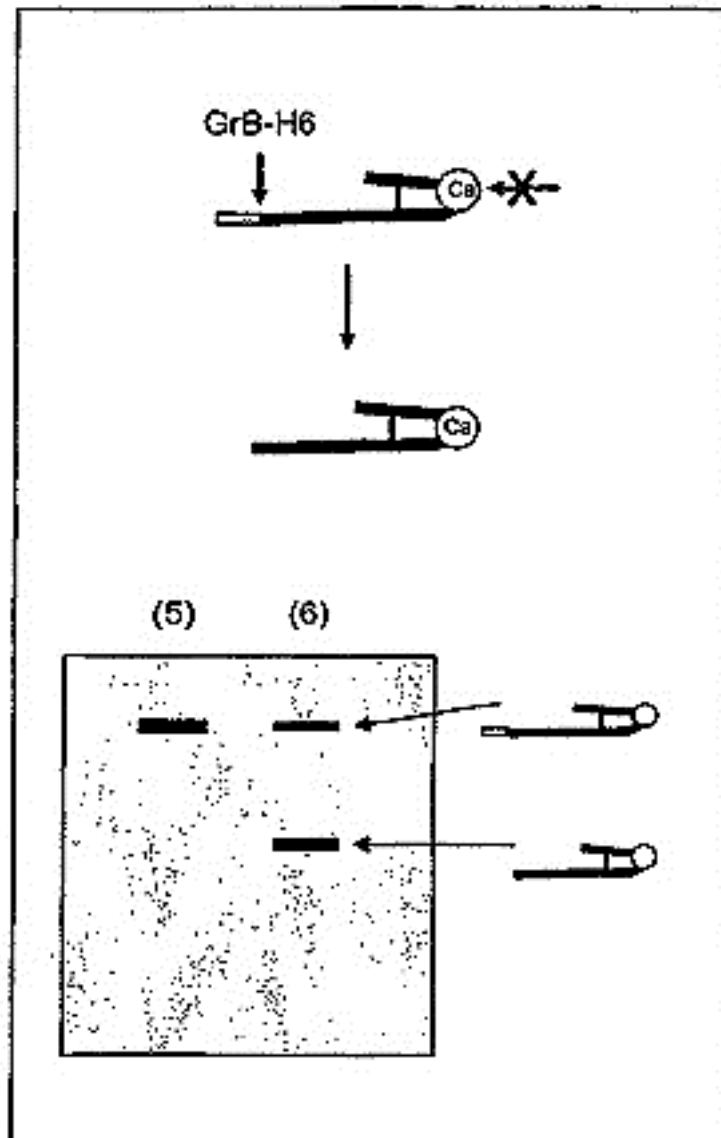


Figura 16

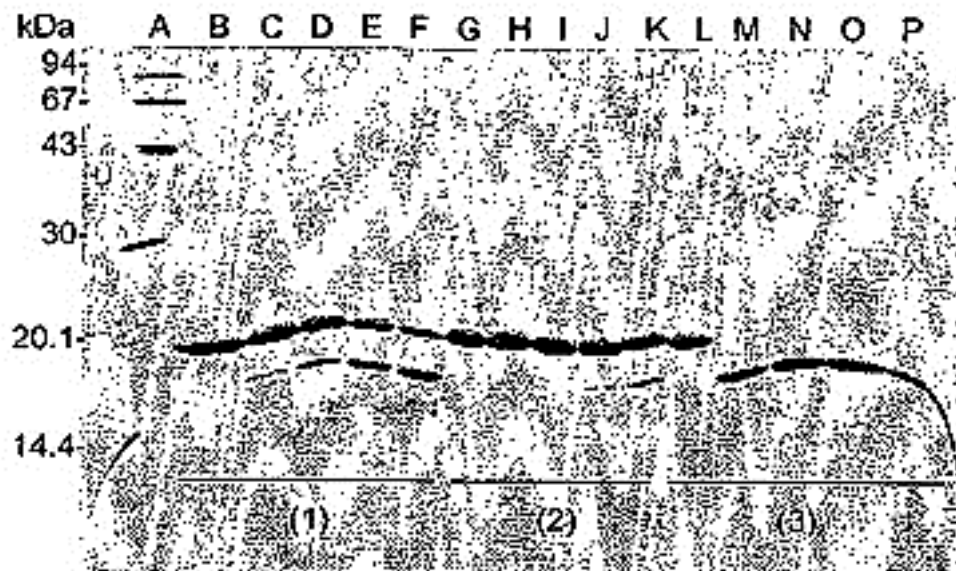


Figura 17

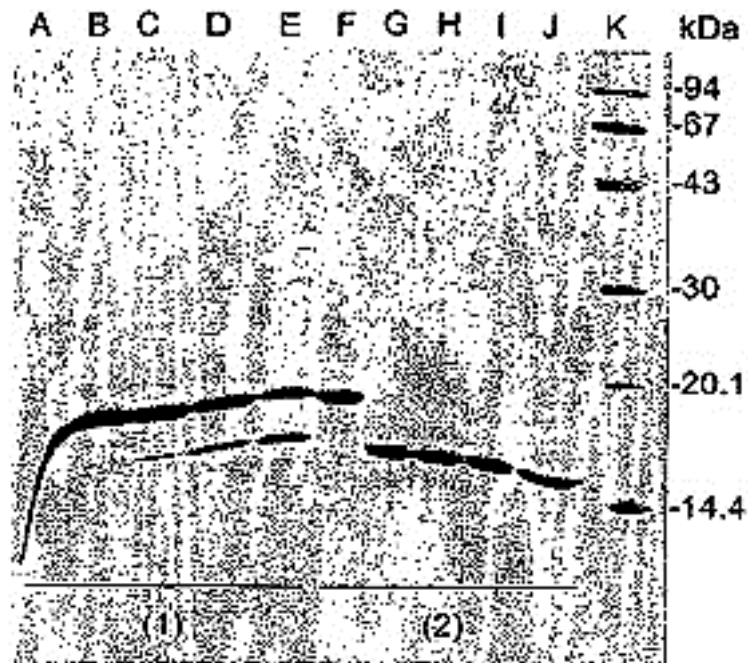


Figura 18

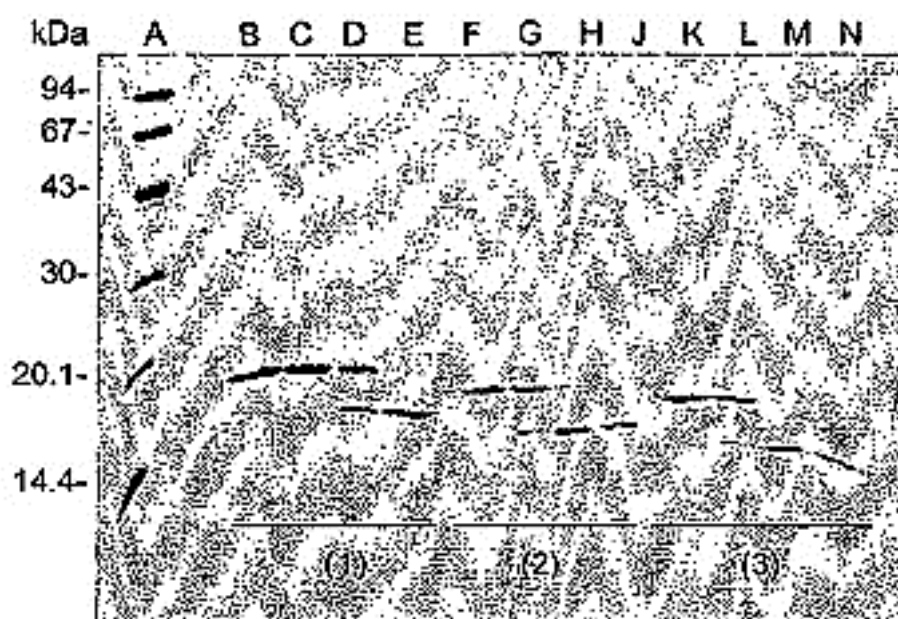
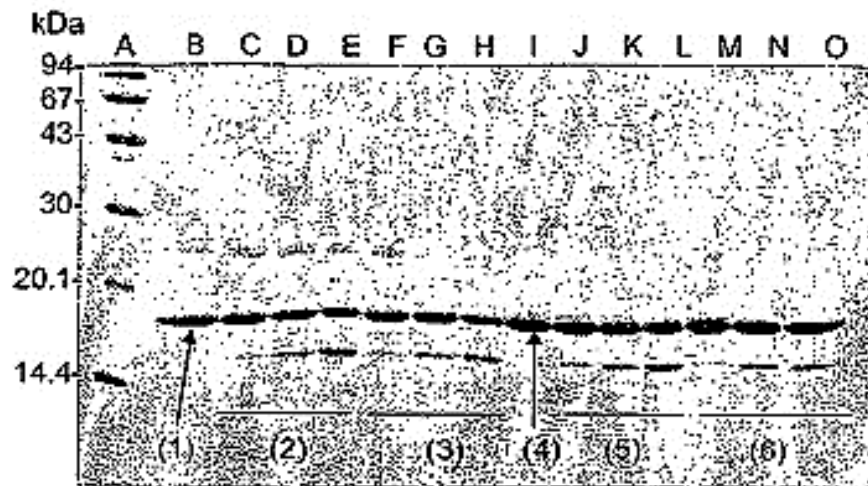


Figura 19

A



B

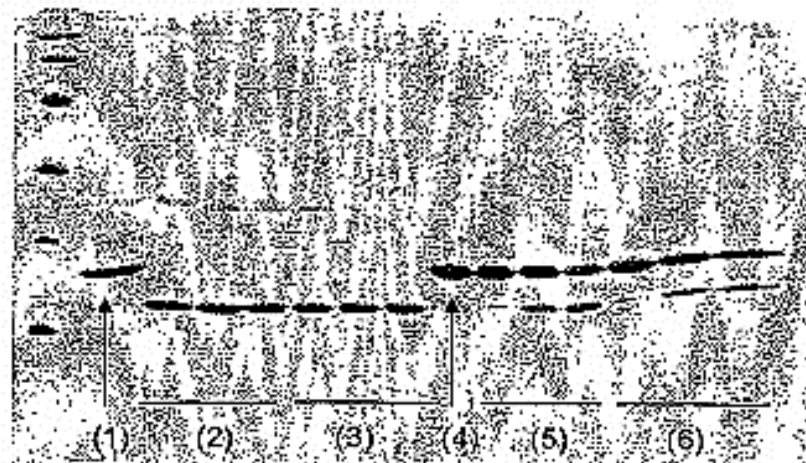


Figura 20

