

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 853**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C07K 14/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2012 PCT/IB2012/052853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 12872941 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2831262**

54 Título: **Secreción de insulina glargina funcional directamente en el medio de cultivo mediante la sobreexpresión intracelularmente de Kex2p**

30 Prioridad:

**29.03.2012 IN CH12282012**

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

**27.04.2018**

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)  
20th K.M. Hosur Road, Electronic City P.O.  
Bangalore 560 100, IN**

72 Inventor/es:

**GOVINDAPPA, NAGARAJ;  
SREENIVAS, SUMA;  
KANOJIA, KOMAL, N;  
BASAVARAJU, YOGESH y  
SASTRY, KEDARNATH, NANJUND**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 665 853 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

Secreción de insulina glargina funcional directamente en el medio de cultivo mediante la sobreexpresión intracelularmente de Kex2p

5

**Campo de la técnica**

La divulgación se refiere a un método de obtención de insulina glargina funcional biológicamente activa en el medio de cultivo sin el uso de la enzima proteolítica tripsina en el procesamiento corriente abajo. Más específicamente, la divulgación se refiere al diseño de un sistema de expresión co-expresando Kex2p utilizando el promotor FLD1 en *Pichia pastoris* para producir dos cadenas de glargina funcional en el medio para hacer posible el procesamiento de la insulina glargina en dos cadenas activas en forma completamente plegada *in vivo*.

10

**Antecedentes y técnica anterior**

15

Las formas recombinantes de glargina se habían producido en sistemas de expresión microbiana, en los que organismos tales como *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* se habían empleado para la producción comercial de insulina recombinante humana y derivados de la misma. Debido a ciertas desventajas de estos sistemas tales como los bajos niveles de expresión, dificultades en la purificación corriente abajo, etc. el uso de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ha sido favorecida como sistema de expresión proteica. El sistema de expresión ofrece varias ventajas tales como alta expresión, procesamiento sencillo, bajo coste de producción, cultivo de alta densidad (documento US6800606).

20

La insulina glargina es un análogo de la insulina de acción lenta. El uso de *E. coli* como sistema de expresión para la expresión ya existe en la técnica anterior. Como la *E. coli* no tiene la maquinaria celular para plegar el polipéptido expresado y establecer correctamente los puentes disulfuro, existe la necesidad en la técnica de superar dicho problema de plegamiento.

25

El procesamiento de glargina corriente abajo implica el recorte del precursor utilizando tripsina. La tripsina tiene la especificidad de recorte en el extremo carboxilo de ambas 'K' y 'R' (como se muestra en la Fig. 1). Esto da como resultado la generación de más impurezas relacionadas con el producto (como se muestra en la Fig. 1).

30

- 1) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER,
- 2) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK,
- 3) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR,
- 4) GFFYTPKTR
- 5) TRR

35

Las desventajas asociadas con los procesamientos corriente abajo conocidos en la técnica anterior se han remediado en la presente divulgación.

40

El documento US4929553 y sus solicitudes relacionadas se preocupan del procesamiento específico de proteínas secretadas en las células de levadura modificadas genéticamente. Específicamente, esta divulgación se dedica al uso de ADN recombinante para producir Kex2p en mayores cantidades. La expresión de proteínas y el uso de Kex2p para los procedimientos después de la escisión detrás del aminoácido dibásico se conoce en la técnica anterior.

45

El documento WO2008037735 y sus solicitudes relacionadas desvelaban un método para producir insulina humana madura o un análogo en el que el resto de aminoácido del extremo C de la cadena B se escinde mediante una actividad carboxipeptidasa bien en la célula fúngica o posteriormente en el medio de cultivo.

50

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica para producir un procedimiento de producción de una glargina funcional de dos cadenas en el medio para hacer posible el procesamiento de la insulina glargina en dos cadenas activas en forma completamente plegada *in vivo*.

55

**Exposición de la divulgación**

En consecuencia, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de expresión de insulina glargina funcional de dos cadenas completamente plegada que no necesita un procesamiento adicional para hacerla funcionalmente activa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de i) clonar un pro-péptido de glargina y una proteasa en *Pichia pastoris*; en la que, la secuencia que codifica la proteasa se pone bajo el control de un promotor constitutivo o inducible, ii) co-expresar dicho pro-péptido y la proteasa y iii) obtener una insulina glargina completamente funcional; un procedimiento para convertir la pro-insulina glargina en una insulina glargina biológicamente activa completamente plegada, comprendiendo dicho método las etapas de i) obtener una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la pro-insulina glargina, ii) co-expresar Kex2p bajo el control de un promotor FLD1 de la célula huésped para convertir el pro-péptido de glargina en una insulina glargina

60

65

biológicamente activa completamente plegada.

**Breve descripción de los dibujos adjuntos**

- 5 Las características de la presente divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción tomada en conjunto con los dibujos adjuntos. Entendiendo que los dibujos representan solo varias realizaciones de acuerdo con la divulgación y, por lo tanto, no se consideran limitantes de su alcance, la divulgación se describirá con especificidad y detalles adicionales mediante el uso de los dibujos adjuntos:
- 10 La **Figura 1** ilustra el precursor de glargina de cadena sencilla que se secreta en el medio mostrando las flechas negras hacia abajo los sitios de escisión de la tripsina.
- La **Figura 2** ilustra el mapa del vector de Fglargina/pPIC9K.
- 15 La **Figura 3** ilustra la secreción de una Fglargina de cadena sencilla que utiliza la Kex2p proteasa endógena. Se seleccionó la Fglargina nº 1/GS115 para todos los estudios futuros.
- La **Figura 4** ilustra los resultados de peso de F-glargina en GS115 sin Kex2p. Solamente se ve el precursor de F-glargina.
- 20 La **Figura 5** ilustra y representa la secuencia de glargina de cadena sencilla con los sitios de escisión de Kex2p. La proteasa escinde después de los aminoácidos básicos y secreta la glargina de dos cadenas en el medio. Esto no generará ninguna de otras impurezas.
- 25 La **Figura 6** ilustra el mapa del vector  $\Delta$ Kex2p/pGAP bajo el control del promotor intracelular GAP.
- La **Figura 7** ilustra la foto representativa que presenta la resistencia a Zeocina. Las colonias se escogieron, se cultivaron en caldo YPD y se estamparon en placas YPD que contenían 0,5 mg de Zeocina.
- 30 La **Figura 8** ilustra que los clones se indujeron con metanol y el sobrenadante secretado se analizó utilizando SDS PAGE tricina.
- La **Figura 9** ilustra el típico perfil de HPLC que muestra la F-glargina nº 1 sin kex2Ap660. Solamente se obtuvo un pico de precursor de glargina.
- 35 La **Figura 10** ilustra el típico perfil de HPLC que muestra el perfil de expresión de F-glargina con la co-expresión de kex2Ap660 bajo el control del promotor constitutivo GAP. Aparece un pico de precursor de glargina a un TR =9,6 a 10 min y aparece el pico de glargina procesada a los 11,6 a 12 min.
- 40 La **Figura 11** ilustra lo siguiente:
- A) Mostrar los fragmentos de PCR amplificados en tubos separados. El lado izquierdo es el promotor FLD1, el lado derecho es el fragmento Kex2p y la calle del medio es el marcador XDNA EcoRI/Hind3.
  - 45 B) El producto de PCR fusionado se ejecuta en gel de agarosa al 1 %.
  - C) Análisis de restricción de FLD1- $\Delta$ Kex2p/pTZ57R
- 50 La **Figura 12** ilustra el mapa de vector que presenta las características de FLD1-Kex2p/pPICZA
- La **Figura 13** ilustra el análisis de restricción del FLD1-Kex2p/pPICZA: Calle 1 = Digestión con Pst1/EcoRV (alineada), Calle 2 = Digestión con NdeI (se esperan 639 pb, 956 pb, 3407 pb), Calle 3 = Digestión con BstB1 y SacI (se esperan 511 pb, 4448 pb)
- 55 La **Figura 14** ilustra la exploración de aproximadamente 20 clones para confirmar la integración. Todos los clones excepto los clones nº 1, 6, 9 y 13 dan el amplicón de PCR esperado. La calle P es el control positivo en el que se utilizó el plásmido como matriz. La calle 9582 es el control negativo (cepa parental) y la calle M es el marcador de peso molecular de ADN.
- 60 La **Figura 15** ilustra el típico perfil de HPLC que muestra el pico de precursor y los dos picos de cadenas de glargina. La foto indicaba que la conversión es aproximadamente del 90 %.
- La **Figura 16** ilustra el perfil de HPLC del producto de Glargina purificado (2 cadenas).
- 65 La **Figura 17** ilustra el perfil de HPLC de Glargina de 2 cadenas secretada por el clon que sobre-expresa Kex2p (FLD-Kex2p).

La **Figura 18** ilustra el diagrama esquemático de cómo se fabrican las dos cadenas en el huésped *Pichia pastoris* y se secretan en el medio.

La **Tabla 1** muestra el porcentaje de conversión de la glargina de dos cadenas con la co-expresión de  $\Delta$ Kex2p bajo el control del promotor GAP.

La **Tabla 2** muestra el porcentaje de conversión de la glargina de dos cadenas con la co-expresión de  $\Delta$ Kex2p bajo el control del promotor FLD1.

### Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de expresión de una insulina glargina de dos cadenas funcional completamente plegada que no necesita un procesamiento adicional para hacerla funcionalmente activa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de i) clonar un pro-péptido de glargina y una proteasa en *Pichia pastoris* en la que, la secuencia que codifica la proteasa se pone bajo el control de un promotor constitutivo o inducible, ii) co-expresar dicho pro-péptido y la proteasa y iii) obtener insulina glargina completamente funcional.

En una realización de la presente divulgación, el rendimiento de insulina glargina biológicamente activa completamente plegada obtenida por dicho método es mayor del 93 %.

En otra realización de la presente divulgación el pro-péptido de glargina se expone en la SEQ ID NO: 1. En otra realización más de la presente divulgación la proteasa es la Kexina endoproteasa (Kex2p) que se expone en la SEQ ID NO: 2. En otra realización más de la presente divulgación el promotor constitutivo es un promotor GAP. En otra realización más de la presente divulgación el promotor inducible es un promotor FLD1. En otra realización más de la presente divulgación el promotor constitutivo GAP hace posible la sobre-expresión de Kex2p de SEQ ID NO: 2 a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido de la SEQ ID NO: 1 para secretar hasta el 75 % de insulina glargina como un péptido de dos cadenas funcional y completamente plegado que no necesita un procesamiento adicional para hacerla activa.

En otra realización más de la presente divulgación el promotor inducible FLD1 hace posible la sobre-expresión de Kex2p de la SEQ ID NO: 2 a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido de SEQ ID NO: 1 para secretar hasta un 100 % de insulina glargina como un péptido de dos cadenas funcional y completamente plegado que no necesita un procesamiento adicional para hacerlo activo.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento de conversión la pro-insulina glargina en insulina glargina biológicamente activa completamente plegada, comprendiendo dicho método las etapas de obtener una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la pro-insulina glargina y co-expresa Kex2p bajo el control del promotor FLD1 en la célula huésped para convertir el pro-péptido de glargina en una insulina glargina biológicamente activa completamente plegada.

La presente divulgación supera las desventajas asociadas con los procedimientos corriente abajo conocidos de la técnica anterior se han remediado mediante la sobre-expresión de la Kex2p en *Pichia pastoris* para producir glargina funcional de dos cadenas directamente en el medio para evitar las impurezas formadas debido a la tripsina. La presente divulgación se refiere al diseño de un sistema de expresión por la co-expresión de Kex2p y el promotor FLD1 en *Pichia pastoris* para producir glargina funcional en el medio sin el uso de tripsina.

En otra realización, la presente divulgación también proporciona la solución para superar las impurezas formadas corriente abajo debido al uso de la enzima serina proteasa tripsina secretando la glargina funcional directamente en el medio por la sobre-expresión Kex2p intracelularmente bajo la influencia del promotor FLD1. Los resultados sorprendentes de este método no se habían desvelado en ninguna de las técnicas anteriores.

Sin embargo, la presente divulgación desvela un procedimiento de producción de una glargina de dos cadenas funcional en el medio para hacer posible el procesamiento de la insulina glargina en una forma completamente plegada de dos cadenas *in vivo*. El efecto sorprendente es debido a la sobre-expresión de Kex2p en la célula huésped en presencia del promotor FLD1.

El fin de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de obtención insulina glargina de dos cadenas completamente plegada que no necesita un procesamiento adicional para hacerla funcionalmente activa.

El objetivo principal de la presente divulgación es obtener una insulina glargina de dos cadenas completamente plegada que no necesita un procesamiento adicional para hacerla funcionalmente activa.

Otro objetivo más de la presente divulgación es obtener la insulina glargina por co-expresión de un pro-péptido de SEQ ID NO: 1 y Kex2p en *Pichia pastoris*.

Otro objetivo más de la presente divulgación es proporcionar Kex2p sobre-expresado bajo el control del promotor FLD1 inducible, en el que el promotor FLD1 hace posible la sobre-expresión de Kex2p de SEQ ID NO: 2 a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido para secretar hasta un 100 % de insulina glargina como un péptido de dos

cadena funcional y completamente plegado que no necesita un procesamiento adicional en el medio.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de obtención de insulina glargina de dos cadenas completamente plegada que no necesita un procesamiento adicional para hacerla funcionalmente activa. Dicho procedimiento comprende las etapas de:

- i) Construcción de insulina glargina produciendo clones de *Pichia pastoris*;
- ii) Síntesis de la secuencia codificante de insulina glargina (de aquí en adelante Fglargina);
- iii) Transformación de *Pichia pastoris*;
- iv) Co-expresión del promotor FLD1 que dirige  $\Delta$ Kex2p intracelularmente; y
- v) Transformación y exploración de clones en cuanto a la secreción de glargina de dos cadenas.

En otro objetivo más de la presente divulgación la insulina glargina se consigue co-expresando un pro-péptido de SEQ ID NO: 1 y Kex2p en *Pichia pastoris*.

Otro objeto más de la presente divulgación es que la Kex2p se sobre-expresa bajo el control del promotor inducible FLD1.

En otro objeto de la presente divulgación el promotor inducible FLD1 hace posible la sobre-expresión de Kex2p a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido para secretar hasta el 100 % de insulina glargina como un péptido de dos cadenas funcional y completamente plegado que no necesita un procesamiento adicional en el medio.

Como se utiliza en el presente documento "análogo de insulina" es una molécula de insulina que tiene una o más mutaciones, sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de las cadenas de aminoácidos A y/o B con respecto a la molécula de insulina humana nativa. Más específicamente, uno o más de los restos de aminoácido pueden haberse intercambiado con otro resto de aminoácido y/o uno o más restos de aminoácidos se han eliminado y/o uno o más restos de aminoácidos pueden haberse añadido, a condición de que dicho análogo de insulina tenga una actividad de insulina suficiente. Los análogos de insulina preferentemente son de tal manera que uno o más de los restos de aminoácidos de origen natural, preferentemente uno, dos o tres de ellos, se han sustituido con otro resto de aminoácido codificable. Se describen ejemplos de análogos de insulina en las siguientes patentes y equivalentes de las mismas: US 5.618.913, EP 254.516, EP 280.534, US 5.750.497 y US 6.011.007. Ejemplos de análogos específicos de insulina son la insulina aspart (es decir, insulina humana AspB28) y la insulina lispro (es decir, insulina humana LysB28, ProB29) y la "insulina glargina" (insulina humana Lys B(3), Glu B(29)).

La tripsina es una serina proteasa típica e hidroliza una proteína o un péptido en el carboxilo terminal de un resto de arginina o lisina (Enzymes, pp 261 -262(1979), ed. Dixon, M. & Webb, E. C, Longman Group Ltd., London). En particular, ocurre una hidrólisis fácil en un sitio dibásico en el que se encuentran dos restos sucesivos de arginina o lisina, y se sabe que la hidrólisis se produce más fácilmente cuando el sitio dibásico se localiza en o cerca de una estructura de giro  $\beta$  (Rholam, M., et al., FEBS Lett., 207, 1-6(1986). The Enzyme Vol. II, 3ª Edición, Editor Boyer, Acad. Press NY. Pp. 249-275). Particularmente, la tripsina escinde los enlaces peptídicos del extremo C de los restos de arginina (Arg) o lisina (Lys). La escisión triptica de las moléculas precursoras de insulina puede producirse en diferentes sitios de escisión simultáneamente. Debido a los muchos sitios de escisión en la molécula precursora de insulina específica, se pueden formar muchos productos colaterales no deseados durante la reacción de escisión triptica.

La presente divulgación proporciona vectores que comprende el ADN que codifica cualquiera de los genes descritos en el presente documento. También se proporciona la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser bacterianas, fúngicas, o de mamífero.

La presente divulgación emplea una célula huésped recombinante en la que se produce al menos una parte de una secuencia de ácido nucleico que expresa el precursor del compuesto de insulina. Un sistema de expresión recombinante se selecciona de entre huéspedes procariontes y eucariotes. Los huéspedes eucariotes incluyen células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), células de mamífero o las células vegetales. Las células bacterianas y eucariotes están disponibles en varias fuentes diferentes incluyendo fuentes comerciales para los expertos en la técnica, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, MD). Las fuentes comerciales de células que se utilizan para la expresión proteica recombinante también proporcionan instrucciones para el uso de las células. La elección del sistema de expresión depende de las características deseadas para el polipéptido expresado.

Más preferentemente relacionadas con los aspectos de la presente divulgación, las células huésped más preferidas son las levaduras metilotróficas. Las cepas de una levadura metilotrófica que se puede modificar utilizando la

presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, cepas de levadura capaces de crecer en metanol, tal como las levaduras del género *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, o *Torulopsis*. Las levaduras metilotróficas preferidas son las del género *Pichia*. Las cepas de levadura metilotróficas que se pueden modificar utilizando los presentes métodos también incluyen las cepas de levadura metilotróficas que se han modificado para expresar una o más proteínas heterólogas de interés.

El término “promotor” se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión de ARN polimerasa.

El término “vector” incluye vectores de expresión, vectores replicables, vectores de transformación, y vectores lanzadera, incluyendo combinaciones de vectores de los mismos.

La expresión “vector de expresión” significa una construcción capaz de la expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo. El término “incorporado” preferentemente cubre la incorporación estable en el genoma.

En biología molecular, la transformación es la alteración genética de una célula que resulta de la captación directa, incorporación y expresión de un material genético exógeno (ADN exógeno) de sus alrededores y que se incorpora a través de la membrana celular.

La célula huésped u organismo se puede modificar para que exprese una proteína o péptido recombinante utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, la proteína recombinante se puede expresar a partir de un vector o a partir de un gen exógeno insertado en el genoma del huésped.

La expresión del gen que codifica las dos cadenas de insulina glargina es controlada por un promotor (por ejemplo, un promotor inducible o un promotor constitutivo). Preferentemente, el promotor es un promotor fuerte, más preferentemente un promotor fuerte inducible, que permite la producción de grandes cantidades del producto deseado. Las células transformadas con el gen pueden ser fúngicas. Para la expresión en *Pichia pastoris*, el promotor que se utiliza para dirigir la expresión del gen es preferentemente el promotor GAP (un fuerte promotor constitutivo) o el promotor AOX1, o AOX2 (un fuerte promotor inducible) y el FLD1 fuerte.

Los vectores que se pueden utilizar para expresar proteínas se conocen bien en la técnica y se describen posteriormente.

Como se utiliza en el presente documento, el término “expresión” se refiere a un proceso por el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

Como se utiliza en el presente documento, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce las síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, (es decir, en la presencia de nucleótidos y un agentes de inducción tal como una ADN polimerasa y una temperatura y pH adecuados).

#### 45 **Ejemplo 1:**

#### **Protocolos adaptados para producir dos cadenas de insulina glargina en *Pichia pastoris***

##### 50 **1.1 Construcción de un clon productor de insulina glargina en *Pichia pastoris***

La secuencia de insulina glargina (de aquí en adelante Fglargina) (SEQ ID NO: 1) sin la secuencia líder se clona en el vector de expresión de *Pichia* y se transforma en *Pichia pastoris*. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de Fglargina de SEQ ID NO: 1 es la siguiente:

**FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRGIVEQCCTSICSLYQLEN**  
**YCG**

##### **1.2 Síntesis de la secuencia codificante de Fglargina**

Se optimizó el codón de la secuencia codificante de Fglargina para la expresión en *Pichia pastoris* y se obtuvo el ADNc sintético de Geneart AG, Alemania. El fragmento deseado se amplificó con los cebadores diseñados específicamente para el gen y se clonó en el vector pTZ57RT (Fermentas) y se verificó la secuencia. Después de verificar la integridad de la secuencia, la secuencia codificante sintética de Fglargina se subclonó en el vector de expresión de *Pichia* en los sitios *XhoI/EcoRI* para dar lugar a Fglargina/pPIC9K (pPIC9K es un plásmido). Esta etapa de clonación fusionaba la secuencia codificante de la Fglargina a la secuencia de señal Mat- $\alpha$  para la secreción y se

colocaba bajo el control del promotor AOX1 y el terminador (como se muestra en la Figura 2 y la SEQ ID NO: 1).

## Ejemplo 2

### 5 Transformación de *Pichia pastoris*

La construcción, Fglargina/pPIC9K se transformó por electroporación en *Pichia pastoris* y se seleccionaron los fenotipos His<sup>+</sup>. La transformación se hizo por electroporación en células recién cultivadas en cubetas de 0,2 cm. El pulso se suministró por un Gene Pulser (BioRad) a 1500 V, 25 mF, y 200 Ω. Se permitió que las células electroporadas se recuperaran durante 1 hora en 1 M de sorbitol a 30 °C y entonces se diseminó la mezcla de transformación en placas YNBD agar. Se exploraron 1200 transformantes en cuanto a la integración de múltiples copias de las construcciones de Fglargina en el genoma por su resistencia a concentraciones sucesivamente mayores de G418 (antibiótico aminoglucósido Geneticina). Se siguieron los protocolos convencionales recomendados por el fabricante (Invitrogen, Inc.) para la exploración y la expresión. los clones escogidos con esta base se recogieron para los estudios de expresión. Se selecciona el Fglargina n° 1/GS115 (seleccionado de entre la lista de los 1200 transformantes desvelados anteriormente) para todos los estudios futuros. La productividad de un precursor de cadena sencilla se comprobó en el estudio de matraz de agitación (Figura 3) y solamente se verá el precursor de Fglargina sin Kex2p (como se muestra en la Figura 4).

20 *Pichia pastoris* GS115 es un huésped His<sup>-</sup>. No puede crecer en un medio mínimo sin suplemento del aminoácido Histidina. El vector pPIC9K tiene el gen His 4. Cuando el vector se transforma para el huésped GS115, el huésped se convierte en His<sup>+</sup>. Puede crecer en un medio mínimo. Esto también se explica en el manual de expresión en *Pichia* (Invitrogen).

## 25 Ejemplo 3

### Co-expresión de Kex2p bajo el control del promotor GAP

30 A partir de la Figura 4 se entiende bien que no es posible secretar glargina de dos cadenas directamente en el medio utilizando solo la Kex2p endógena. Por lo tanto, se ha intentado la co-expresión de la Kex2p con el promotor GAP para aumentar el nivel de proteasa endógenamente.

## Ejemplo 4

### 35 Construcción de una única copia de ΔKex2p con el promotor GAP

La Kexina endoproteasa (Kex2p) es una proteína unida a las membranas de 777 aminoácidos. Es muy difícil producir esta enzima mediante tecnología recombinante. Tiene una especificidad de sustrato para escindir después de aminoácidos dibásicos como RR, KR, KK y RK. Los más preferidos entre los cuatro son KR y RR y escasamente corta después de RK y KK (véase la Figura 5). A partir de la técnica anterior, como se desvela en el documento EP0794254A2 solamente el dominio citosólico de 660 aminoácidos de *S. cerevisiae* es suficiente para la actividad. De manera similar, en la presente divulgación el dominio funcional de Kex2p de 660 aminoácidos de la *Pichia* se seleccionó para la expresión en *Pichia pastoris*. La amplificación por PCR del gen se lleva a cabo en correspondencia a este dominio funcional utilizando el ADN genómico de *Pichia pastoris* como matriz. La construcción plasmídica se desarrolla clonando el DCS de Kex2p de 660 aminoácidos (de aquí en adelante ΔKex2p) en fase con el promotor GAP sin el péptido de señal Mat-α para la expresión intracelular como se muestra en la Figura 6 y la SEQ ID NO: 2.

## Ejemplo 5

### 50 Transformación y estudios de expresión en matraces de agitación

- El plásmido ΔKex2p/pGAP se transforma en el huésped Fglargina n° 1/GS115 utilizando un protocolo convencional. Los transformantes obtenidos se seleccionaron en cuanto a la resistencia a Zeocina a una concentración de 0,5 mg/ml (como se muestra en la Figura 7). Basándose en el buen crecimiento en placas que contenían Zeocina, se analizaron los siguientes clones en cuanto a la secreción de las dos cadenas de glargina (como se muestra en la Figura 8). La secreción de dos cadenas es parcial y es aproximadamente de un 50 a 60 % (como se muestra en la Tabla 1). El clon n° 6D6 daba la máxima secreción de dos cadenas del 60 %.
- Unos pocos clones se indujeron y sometieron a un análisis HPLC para encontrar los picos de glargina de dos cadenas (como se muestra en la Figura 9 y la Figura 10). La transformación satisfactoria de ΔKex2p/pGAP en el huésped productor de Fglargina tiene lugar con la conversión o secreción de glargina de dos cadenas variaba desde aproximadamente del 10 % al 60 % (como se muestra en la Tabla 1). Sin embargo, como no se alcanzaba la secreción del 100 % de glargina de dos cadenas; se necesitaba un procedimiento que aumentara la secreción de glargina de dos cadenas en el medio.

65

**Tabla 1:** Conversión del porcentaje de glargina de dos cadenas con la expresión de  $\Delta$ Kex2p bajo el control del promotor GAP

Nombre del clon /nº	Volumen de inyección ( $\mu$ l)	Área del pico de precursor	Área del pico total	Área del pico de glargina de dos cadenas	% de conversión alcanzado
Fglargina de control	50,00	571,3	571,3	0,00	0,00
Clon nº IB4	50,00	727,9	836,9	109	13,02
Clon nº 5C5	50,00	454,9	826,5	371,6	44,96
Clon nº 3C1	50,00	403,2	588,2	185	31,45
Clon nº 4B7	50,00	485,2	731,1	245,9	33,63
Clon nº 2F6	50,00	1386,5	1531	144,5	9,44
Clon nº 6D6	50,00	494,22	1221,02	726,8	59,52

**Resultados**

5 Los resultados de la Tabla 2 indican que el procedimiento anterior transformaba satisfactoriamente el  $\Delta$ Kex2p/pGAP en el huésped de producción de Fglargina. Las colonias se exploraron para obtener los clones con resistencia a Zeocina más alta que daba lugar a la construcción con la expresión de mayor número de copias. La secreción de glargina de dos cadenas variaba desde aproximadamente un 10 % a un 60 %.

10 Sin embargo, los inventores fueron incapaces de conseguir la secreción del 100 % de glargina de dos cadenas en el medio.

**Ejemplo 6****Co-expresión del promotor FLD1 que dirige  $\Delta$ Kex2p intracelularmente**

15 Con el fin de la secreción de un 100 % de glargina de dos cadenas, se llevó a cabo la co-expresión por  $\Delta$ Kex2p bajo el control del promotor constitutivo GAP. Por lo tanto, se decidió también utilizar el fuerte promotor inducible FLD1 para obtener dicha alta secreción.

**Ejemplo 7****Clonación de Kex2p bajo el control del promotor FLD1**

25 Para secretar el 100 % de glargina de dos cadenas directamente en el medio de cultivo se ha llevado a cabo la co-expresión de  $\Delta$ Kex2p bajo el control del promotor FLD1.

**Procedimiento**

30 El promotor FLD1 se amplifica por PCR utilizando los siguientes cebadores directos, FLD (BamH1) FP (5' GCG GAT CCG CAT GCA GGA ATC TCT GGC ACG G 3') y FLD-Kex FP (A5' CAA TTC TTG ATA TTC ACA ATG TAT TTG CCA GCA C 3'). El  $\Delta$ Kex2p se amplificó por PCR utilizando los siguientes cebadores inversos FLD-Kex RP (5' GCG AAG TGC TGG CAA ATA CAT TGT GAA TAT CAA GAA 3') y Kex (Sac) RP (5' GGA GCT CGT TTA TGC AAA TAA TGA GAG GGC C 3') (como se muestra en la Figura 10). Estos productos se purificaron en gel utilizando un kit de extracción en gel y se llevó a cabo una PCR de solapamiento para fusionar el producto utilizando los cebadores FLD (BamH1)FP y Kex (Sac)RP.

40 El producto de la PCR fusionado se clonó en el vector pTZ57R. Se llevaron a cabo el análisis de restricción y la verificación de secuencia para confirmar la autenticidad (como se muestra en la Figura 11). Se comprobó que análisis de digestión de restricción y las secuencias de nucleótidos eran correctos. Todas las digestiones de restricción daban los fragmentos esperados (como se muestra en la Figura 11).

**Ejemplo 8****Subclonación de FLD1-Kex2p en el vector pPICZA**

45 El FLD1-Kex2p se subclonó en el vector pPICZA como se muestra en la Figura 12 y se confirmó por digestión de restricción (como se muestra en la Figura 133). Se comprobó que todas las digestiones de restricción eran correctas.

**Ejemplo 9**

**Transformación y exploración de clones en cuanto a la secreción de glargina de dos cadenas**

- 5 El vector FLD1-Kex2p/pPICZA se alineó con BspHI (Real) y se utilizó para la transformación de BICC 9582 que es el huésped de expresión de FGIargina. La transformación se llevó a cabo por electroporación utilizando el Biorad Gene Pulser XL y la mezcla de transformación se seleccionó sobre YPDS que contenía 100 µg/ml de Zeocina. Las placas se incubaron a 30 °C para que aparezcan los transformantes.
- 10 Los transformantes se exploraron mediante PCR de colonias para encontrar la integración de FLD1-Kex2p en BICC9582 utilizando los cebadores FLD, promotor FP y Kex(Sac)RP. El tamaño del amplicón esperado era de -975 pb (véase la Figura 14). Entre los clones positivos que se obtuvieron, se utilizaron el clon nº 5, 7, 23 y 26 para la evaluación.

**15 Ejemplo 10**

**Análisis HPLC de la Fglargina secretada**

- 20 Los clones seleccionados se cultivaron en un medio de expansión para desarrollar la masa celular. Se indujeron entonces utilizando metanol como en el protocolo convencional. Las muestras se analizaron por HPLC para comprobar la secreción de glargina de dos cadenas como se muestra en la Figura 15. El FLD1 que dirige Kex2p se capaz de convertir >93 % del precursor en glargina de dos cadenas completamente plegada y se secreta en el medio como se muestra en la Tabla 2.

**25 Tabla 2**

El porcentaje de conversión de glargina de dos cadenas con la co-expresión de ΔKex2p bajo el control del promotor FLD1.

**30 Porcentaje comparativo de la mejora de rendimiento de insulina glargina de dos cadenas**

Nombre del clon de insulina-glargina recombinante	% de aumento de rendimiento
Clon de Insulina-glargina sin co-expresión	0-5
Precursor de Insulina-glargina con la sobre-expresión de Kex2p utilizando el <b>promotor GAP</b>	60
Precursor de Insulina-glargina con la sobre-expresión de Kex2p utilizando el <b>promotor FLD1</b>	>93

**Resultados:** El FLD1 que dirigía la Kex2p es capaz de convertir más del 93 % del precursor en glargina de dos cadenas completamente plegada y secretarse en el medio.

35

**Ejemplo 11**

**Análisis SDS PAGE de los clones de glargina de dos cadenas**

- 40 Las muestras inducidas se analizaron utilizando SDS PAGE tricina junto con los controles (como se muestra en la Figura 15). Es evidente en la foto del gel que los clones que co-expresaban FLD1-Kex2p secretaban glargina de dos cadenas en el medio de cultivo muy eficazmente.

LISTADO DE SECUENCIAS

45

<110> BIOCON LIMITED

<120> SECRECIÓN DE INSULINA GLARGINA FUNCIONAL DIRECTAMENTE EN EL MEDIO DE CULTIVO MEDIANTE LA SOBREENPRESIÓN DE KEX2P INTRACELULARMENTE

50

<130> PCT1218/SFrk

<160>8

55

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 665 853 T3

	<211> 159		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia sintética		
5	<220>		
	<221 > gen		
	<222> (1)..(159)		
	<400> 1		
10	tttgttaacc aacatttgtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgggt		60
	gaaagagggt ttttttacac tccaaagact agaagaggta ttggtgaaca atgttgtact		120
	tctatttgtt ctttgtacca attggaaaac tactgtggt		159
	<210> 2		
	<211> 1983		
15	<212> ADN		
	<213> <i>Pichia pastoris</i>		
	<220>		
20	<221 > Secuencia de Kex2P truncada		
	<222> (1)..(1983)		
	<400> 2		
	atgtatttgc cagcacttcg cttagcatgc tggatcttaa ttggtcttag gtctacggag		60
	gctttggaga cttccgagag agagatcttt gctctcaagc tggataaatc ctggcttcca		120
	acgtttctag aaacgttcca agataagttc aggtatgaaa gacagatcaa cggtttggat		180
	gactaccatg ttttttcaca cagtaagaac gaagagtffc agttagagaa ctttaaagtg		240
	aagactcttt tgacgcgaga caacgccaat cttcactccg aactgatttc ccacaatgtg		300
	gacgaggffc acatgctaag gccctctcat tatttgcata aacgagctcc tgttgtgatg		360
	gacaagtcag aggaattaag agaacaaata gcgaaggatt ttgacattga tgacccttta		420
	tttgcataaac agtggcatct atttaatcct cgttaccag gacacgacgt gaacgtgtcg		480
	caagtttggg acgatggtat cactggaaaa ggtgtagtga ccgccatagt tgatgacgga		540
	ctagatatgg acagtaaaga tctcaaagaa tctttttgtg aggaaggatc ttgggatttc		600
25	aatgccaaaca ctagactacc caaaccaaga cttagagacg atcaccacgg aaccagatgt		660

ES 2 665 853 T3

gcagcggaga ttgcagctaa gaagggaaat aaatactgtg gagttggtgt ggcatatgat 720  
 tcaaaggttt ctggcatcag gattccttagt gataaaatca caccagagga tgaagctctc 780  
 tccttaatct acggtcttga tgtcaacgac atttattcat gttcatgggg gccagcagac 840  
 aatggaatca caatgcaagg tcccagctcg ttagtcaaag aagccatgct taaaggagtt 900  
 caggatggaa gaaagggtaa aggtgcgctg tatgtattcg ccagtggaaa cggagcatct 960  
 tctggtgata actgcaattt tgacgggtac accaatagca tttattccat aacagttggg 1020  
 gcaattgata ttaaagggtc tcatccacca tacgctgagg cttgctctgc tgtgatgact 1080  
 gtcacataca gttctggatc gggtgagcac atacacacaa ccgacatcaa cgataaatgt 1140  
 tctgataccc atggaggaac atccgctgct gcaccttag cggctggtct ttattctttg 1200  
 gtttatcagg ctaatccgga cctgacttgg cgagatattc aatggctgac tgttttaaca 1260  
 gccgttcctg ttaacgaaca ggagcctggc tggcagaaga ctgctatcgg taagatgtat 1320  
 tctcataaat acggatatgg caagatcgat gcatatgcac tggccaatct agcaagatct 1380  
 ccgacttcc cgtatctcaa accacaaaagc tggatttatg gcaactgagg tcacgaaagc 1440  
 ttgaatactt ccgaagctaa cgggtgtgctg acatccaagt atgaattgac ccaggaggcc 1500  
 aaagatctaa tgaactttga aaaaattgag catgttacgg ttactgtaga tataaaggcg 1560  
 gcggaaagag gtaaagttct tgttgagttg atctcccctt caggtgttgt cagtgaattg 1620  
 gctccctatc gaagaatgga caaggataag gaaggatttc caaattggac gttcatgtca 1680  
 gtagctcatt ggggtgaaga cgggttagga gagtggatat tgaaaatcac taacaaagaa 1740  
 ggaaattctg tgggtgcttaa ctccctggcaa ataaaattct ttggagaaag tcaagaccct 1800  
 gaaaaggctg aaaaattctc tttaactaag aaatatgacg aaatattagt caaccctcca 1860  
 tcttcatcta cttccacgac agtggacacc tcatctacag aagccacttt ttcgtcttcc 1920  
 tctgtttcag aggcttcagc cacggaaaacg gatgtaaaag agacttctac aaccggtgat 1980  
 taa 1983

<210> 3  
 <211> 603  
 <212> ADN  
 <213> *Pichia pastoris*

5

<220>  
 <221 > promotor  
 <222> (1)..(603)

10

<400> 3

ES 2 665 853 T3

ggatccgcat gcaggaatct ctggcacggt gctaattgta gttatccaac ggagctgagg 60  
tagtcgatat atctggatat gccgcctata ggataaaaac aggagaggggt gaaccttgct 120  
  
tatggctact agattgttct tgtactctga attctcatta tgggaaacta aactaatctc 180  
atctgtgtgt tgcagtacta ttgaatcgtt gtagtatcta cctggagggc attccatgaa 240  
ttagtgagat aacagagttg ggtaactaga gagaataata gacgtatgca tgattactac 300  
acaacggatg tcgcactctt tccttagtta aaactatcat ccaatcacia gatgcgggct 360  
ggaaagactt gctcccgaag gataatcttc tgcttctatc tcccttctc atattggttc 420  
gcagggctca tgccccttct tccttcgaac tgcccgatga ggaagtcctt agcctatcaa 480  
agaattcggg accatcatcg attttagag ccttacctga tcgcaatcag gatttcaacta 540  
ctcatataaa tacatcgctc aaagctccaa ctttgcttgt tcatacaatt cttgatattc 600  
  
aca 603

<210> 4  
<211> 483  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

<220>  
<221 > promotor  
<222> (1)..(483)

<400> 4

agatcttttt tgtagaaatg tcttggtgct ctcgtccaat caggtagcca tctctgaaat 60  
atctggctcc gttgcaactc cgaacgacct gctggcaacg taaaattctc cggggtaaaa 120  
cttaaagtgt gagtaatgga accagaaacg tctcttccct tctctctcct tccaccgccc 180  
gttaccgtcc ctaggaaatt ttactctgct ggagagcttc ttctacggcc cccttgagc 240  
aatgctcttc ccagcattac gttgcgggta aaacggaggt cgtgtaccgc acctagcagc 300  
ccagggatgg aaaagtcccg gccgtcgctg gcaataatag cgggaggagc catgtcatga 360  
gattattgga aaccaccaga atcgaatata aaaggcgaac acctttccca attttggttt 420  
ctcctgacct aaagacttta aatttaattt atttgtccct atttcaatca attgaacaac 480  
  
tat 483

<210> 5  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

<220>  
<221> unión del cebador  
<222> (1)..(31)

<400> 5

goggatccgc atgcaggaat ctctggcagc g 31

ES 2 665 853 T3

<210> 6  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

5

<220>  
<221> unión del cebador  
<222> (1)..(36)

10

<400> 6  
gcgaagtgc tggcaataca ttgtgaatat caagaa 36

<210> 7  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

15

<220>  
<221 > unión del cebador  
<222> (1)..(34)

20

<400> 7  
caattcttga tattcacaat gtatttgcca gcac 34

25

<210>8  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

30

<220>  
<221 > unión del cebador  
<222> (1)..(31)

35

<400> 8  
ggagctcgtt tatgcaaata atgagagggc c 31

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una insulina glargina funcional de dos cadenas completamente plegada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 i) introducir un ácido nucleico que codifica un pro-péptido de glargina y un ácido nucleico que codifica una proteasa en *Pichia pastoris*, obteniendo de esta manera una célula huésped de *Pichia pastoris* recombinante; en donde la proteasa es la kexina endoproteasa (Kex2p) codificada por la SEQ ID NO: 2, y en donde la secuencia codificante de la proteasa está bajo el control de un promotor constitutivo o un promotor inducible;
- 10 ii) co-expresar dicho pro-péptido y la proteasa en la célula huésped de *Pichia pastoris* recombinante; y
- iii) obtener una insulina glargina completamente funcional, sin un procesamiento adicional para dar lugar a la insulina glargina funcionalmente activa como un análogo de insulina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped de *Pichia pastoris* recombinante está comprendida en un medio de cultivo, comprendiendo el procedimiento permitir que se secrete la insulina glargina funcional en el medio de cultivo.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el rendimiento de insulina glargina completamente plegada, biológicamente activa como un análogo de insulina, que se obtiene por dicho método, es más del 93 %.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pro-péptido de glargina es codificado por la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor constitutivo es un promotor GAP.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor inducible es un promotor FLD1.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el promotor constitutivo GAP hace posible la sobre-expresión de la Kex2p codificada por la SEQ ID NO: 2 a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido codificado por la SEQ ID NO: 1 para secretar hasta un 75 % de insulina glargina como un péptido de dos cadenas completamente plegado, funcional como un análogo de insulina, que no necesita un procesamiento adicional para hacerlo activo.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor inducible FLD1 hace posible la sobre-expresión de la Kex2p codificada por la SEQ ID NO: 2 a niveles en los que la proteasa escinde el pro-péptido codificado por la SEQ ID NO: 1 para secretar hasta el 100 % de insulina glargina como un péptido de dos cadenas completamente plegado, funcional como un análogo de insulina, que no necesita un procesamiento adicional para hacerlo activo.
- 40 9. Un procedimiento de conversión de la pro-insulina glargina en insulina glargina completamente plegada y biológicamente activa como un análogo de insulina, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 45 i) proporcionar una célula huésped de *Pichia pastoris* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pro-insulina glargina;
- ii) co-expresar la Kex2p bajo el control del promotor FLD1 en la célula huésped para convertir el pro-péptido de glargina en una insulina glargina biológicamente activa y completamente plegada.
- 50 10. El uso de un vector que comprende las secuencias de ADN que codifican un pro-péptido de glargina y la kexina endoproteasa (Kex2p) codificada por la SEQ ID NO: 2, estando la secuencia codificante de la proteasa bajo el control de un promotor inducible o constitutivo, para la producción de una insulina glargina de dos cadenas funcional completamente plegada en una célula huésped de *Pichia pastoris*.
- 55 11. El uso de la reivindicación 10, en el que el pro-péptido de glargina es codificado por la SEQ ID NO: 1.

Secuencia existente de Glargina:

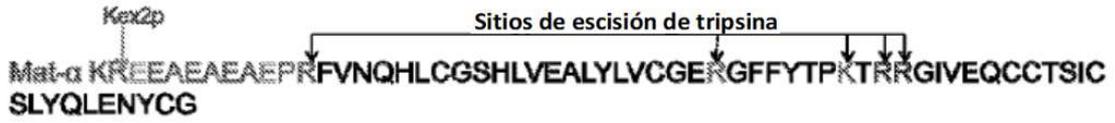


FIGURA 1

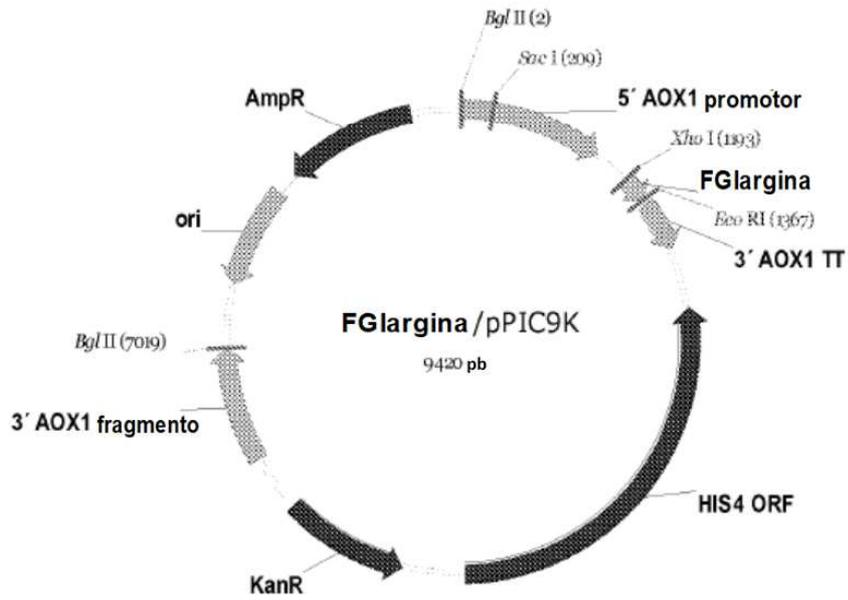


FIGURA 2

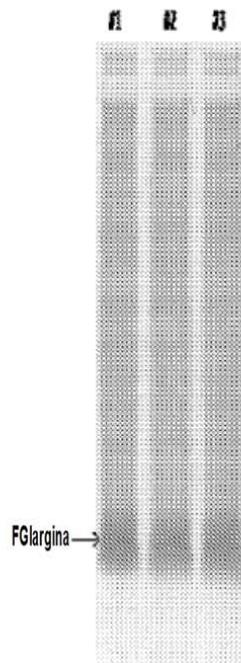


FIGURA 3

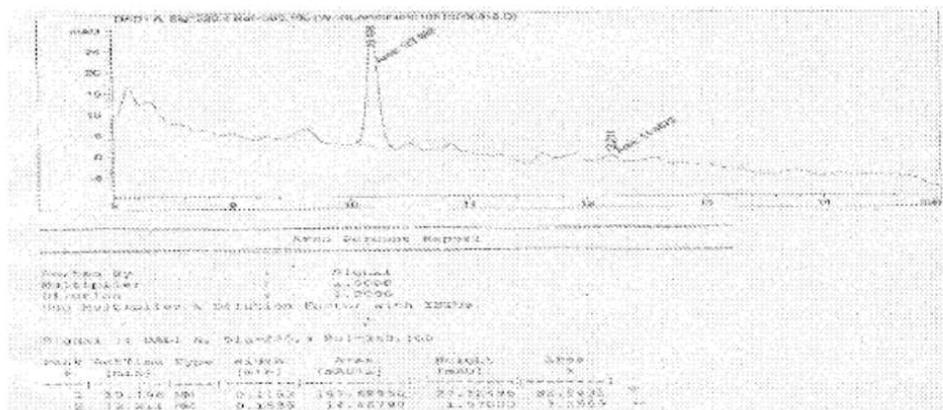


FIGURA 4

Estrategia de secreción de glargina de dos cadenas



FIGURA 5

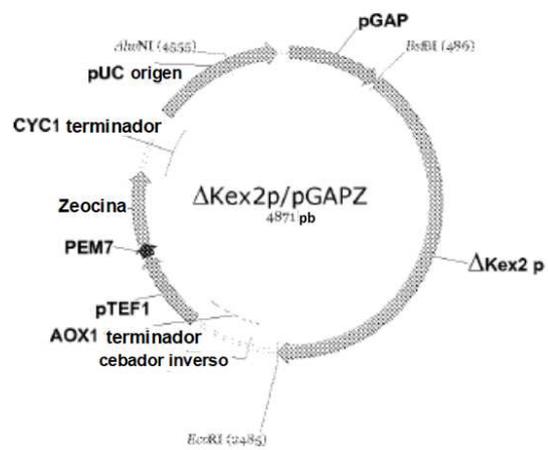


FIGURA 6

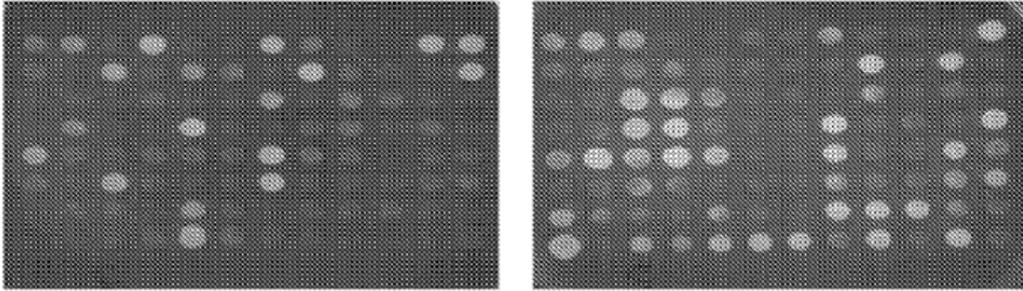


FIGURA 7

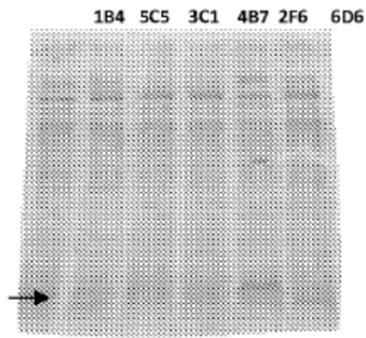


FIGURA 8

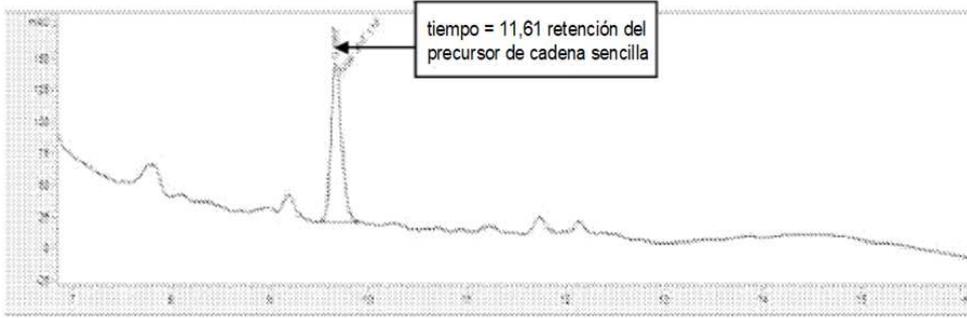


FIGURA 9

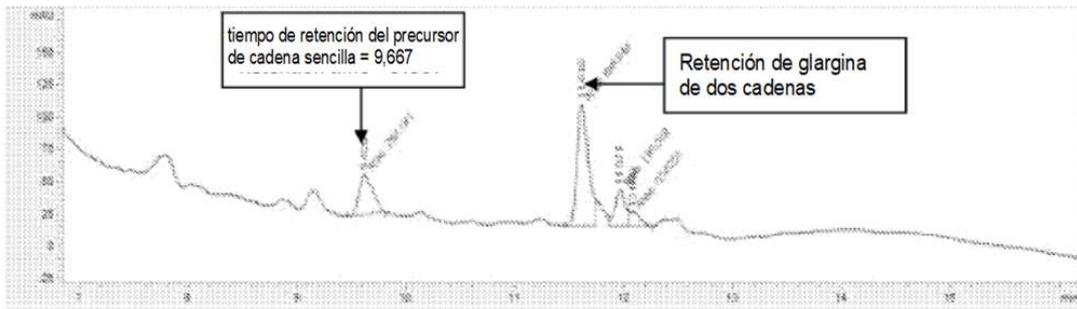
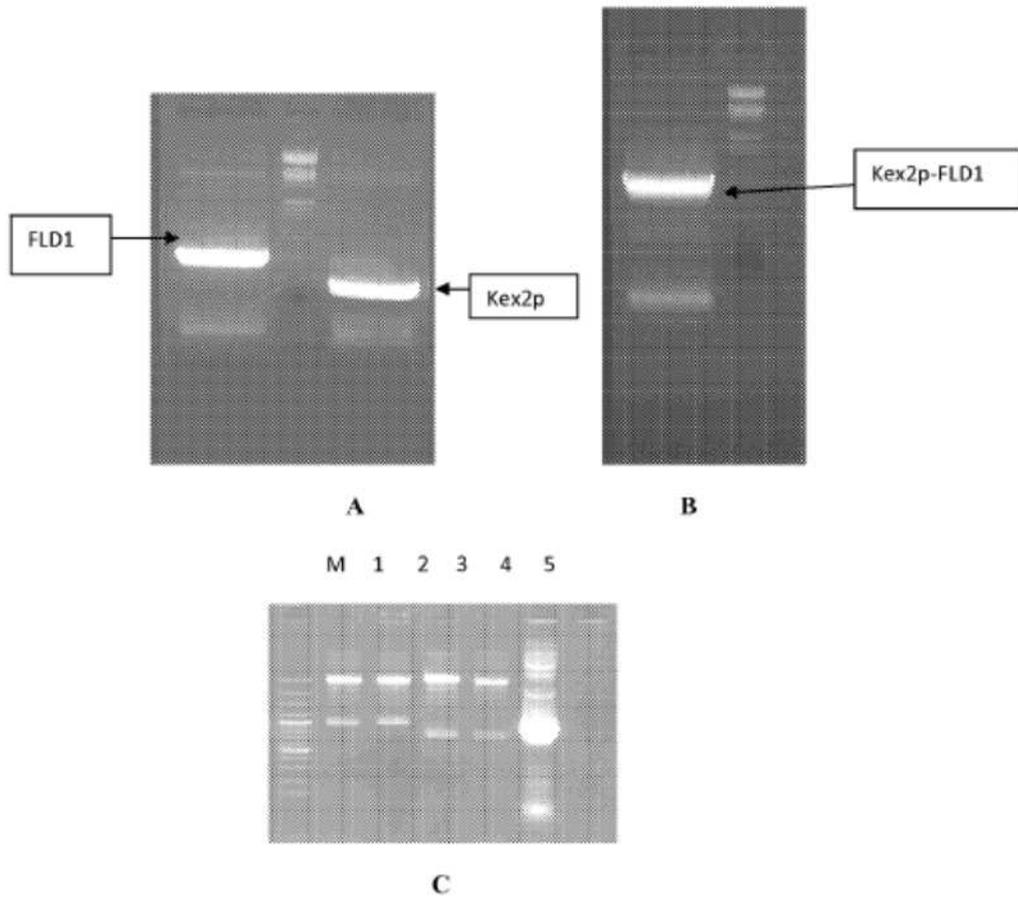


FIGURA 10



Calle M = marcador  
Calle 1 = Plásmido digerido con BamHI  
Calle 2 = Plásmido digerido con SacI  
Calle 3 = Plásmido digerido con XbaI  
Calle 4 = Plásmido digerido con BamHI y XbaI  
Calle 5 = confirmación por PCR utilizando cebador específico del gen

**FIGURA 11:**

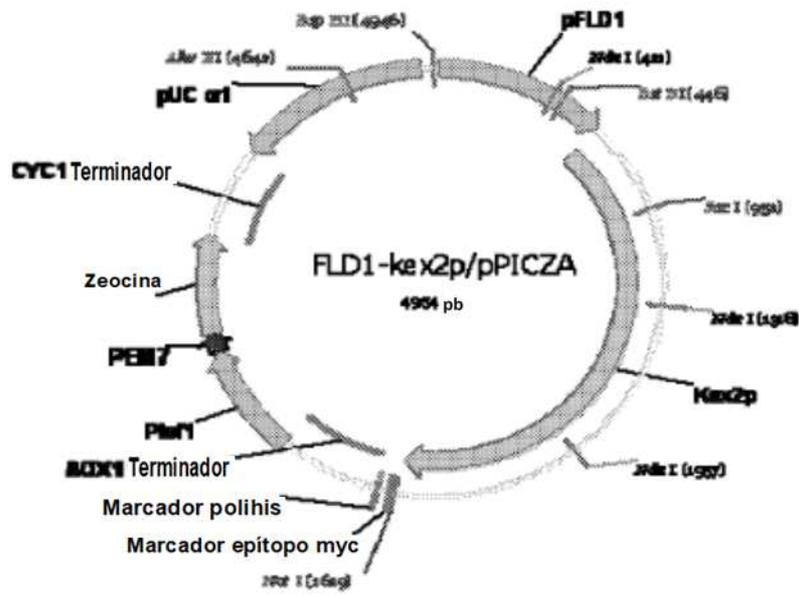


Figura 12

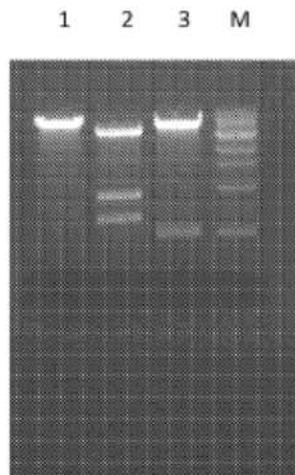
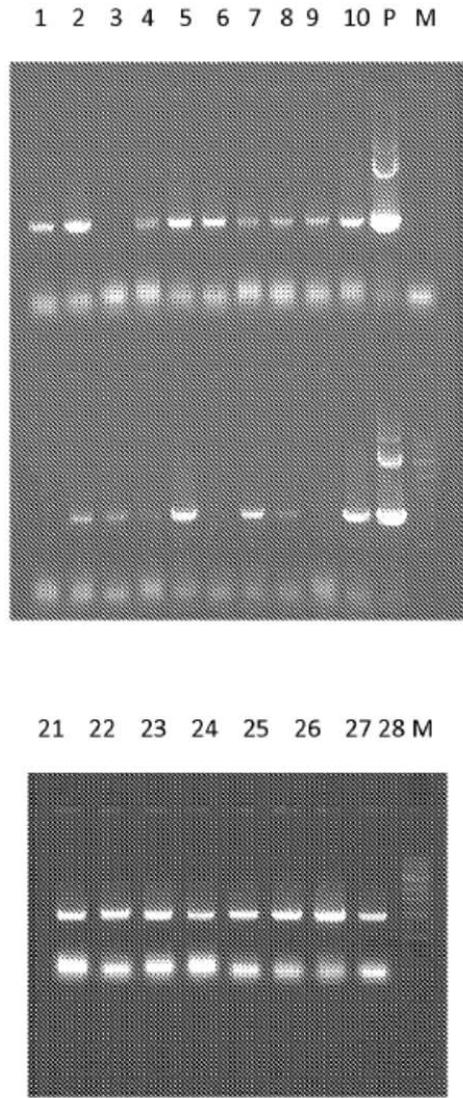


FIGURA 13



**FIGURA 14**

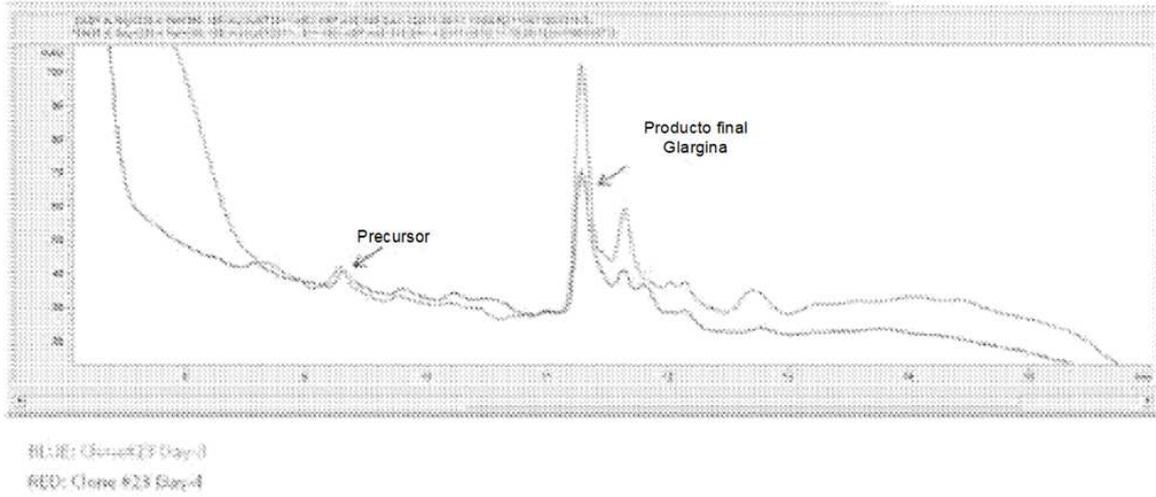


FIGURA 15

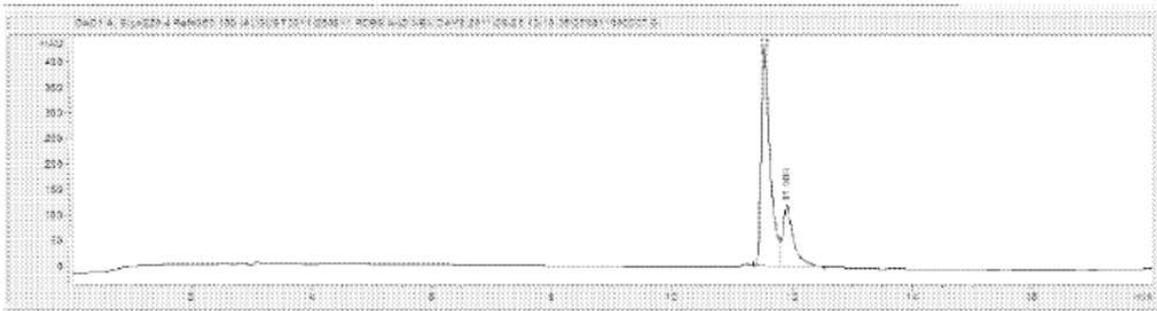


FIGURA 16

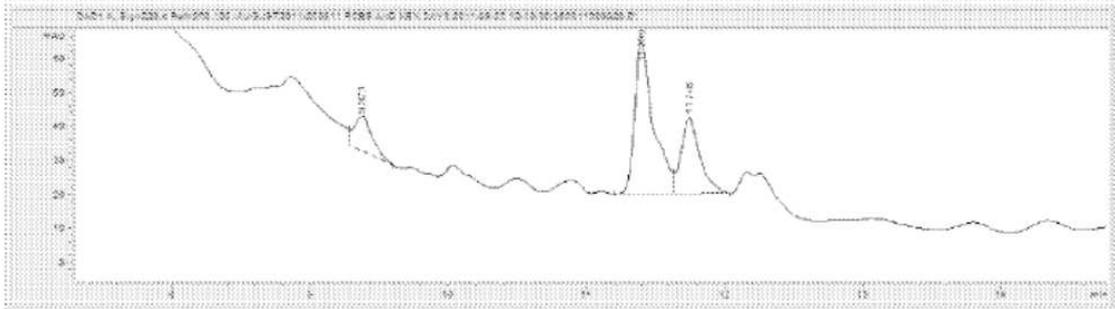


FIGURA 17

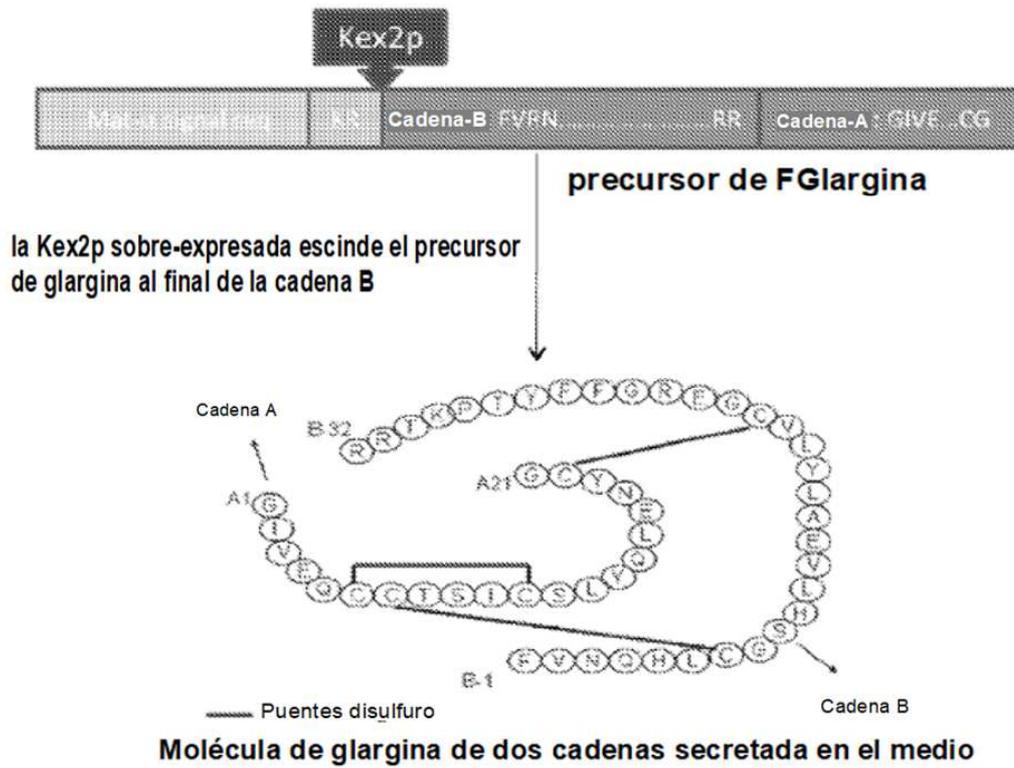


FIGURA 18