

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 532**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/76** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2014 PCT/EP2014/070549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014 E 14781104 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 3052623**

54 Título: **Tripsinógeno humano con una autoactivación reducida y su uso en un inmunoensayo**

30 Prioridad:

**02.10.2013 EP 13187194**

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

**30.05.2018**

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCE INKUBATOR GMBH BONN  
(100.0%)**

**Ludwig-Erhard-Allee 2  
53175 Bonn , DE**

72 Inventor/es:

**BÜTTNER, KARIN;  
PRASSE, AGNETA y  
ZÜCHNER, THOLE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 670 532 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

Tripsinógeno humano con una autoactivación reducida y su uso en un inmunoensayo

5 El tripsinógeno humano (PRSS1) es el precursor inactivo de la enzima tripsina. La enteropeptidasa humana activa el tripsinógeno mediante la escisión de un péptido de activación. Sin embargo, la tripsina o incluso el tripsinógeno también pueden escindir este péptido de activación del tripsinógeno, de forma que el tripsinógeno puede ser activado incluso por mínimas cantidades de tripsina activa o por el propio tripsinógeno. Este proceso se denomina autoactivación.

10 Una aplicación del tripsinógeno se refiere a ensayos de tipo ELISA, en los que la enteropeptidasa es acoplada covalentemente a un anticuerpo y activa el tripsinógeno inactivo en tripsina activa. Entonces la tripsina escinde una molécula de colorante acoplada por FRET (transferencia de energía por resonancia de Förster) portadora de un péptido más o menos en el sitio de escisión, dando lugar a un cambio en la señal óptica del colorante. La anteriormente mencionada autoactivación del tripsinógeno puede provocar una señal de fondo, que afecta negativamente al límite de detección, al intervalo lineal, etc. Por lo tanto, sería deseable una disminución en la autoactivación del tripsinógeno.

20 El registro de la base de datos TRY\_1, Uniprot: PO7477 & MITSURU E ET AL: "Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens", GENE, ELSEVIER, ÁMSTERDAM, NL, val. 41, nº 2-3, 1 de enero de 1986, divulga la secuencia del TRY1 humano, tripsinógeno catiónico o tripsinógeno 1. En el registro de la base de datos se hace referencia a numerosos mutantes, tales como mutaciones en la posición 122 del TRP1, la R122C, y mutaciones en la posición 79, a saber, la E79K.

25 P. SIMON: "Hereditary Pancreatitis Caused by a Novel PRSS1 Mutation (Arg-122 right-arrow Cys) That Alters Autoactivation and Autodegradation of Cationic Trypsinogen", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, nº 7, 8 de febrero de 2002 (2002-02-08), páginas 5404-541002, desvela que el mutante R122C del tripsinógeno humano era más resistente a la autólisis que el natural y se autoactivaba más rápidamente a pH 8. Las tripsinas Cys 122 e His 122 eran expresadas de forma recombinante en *E. coli*.

30 El documento EP2045321 desvela variantes de proteasas de serina, incluyendo algunas variantes de la tripsina catiónica humana que tiene sustituciones de aminoácidos que incluyen el E de la posición 56 por G o R, la R de la posición 99 por H, la K de la posición 115 por M, la Y de la posición 131 por F, N o H, y el D de la posición 139 por N.

35 Las isoformas o los precursores de tipo tripsina 1 con unas elevadas identidades con los polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 o 3 de la presente solicitud se conocen, por ejemplo, a partir de *Pan troglodytes* (véase la URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP001160583>); *Pongo abelii* (véase la URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP0028186171>) y *Macaca mulatta* (véase la URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001040586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001040586)).

45 TEICH ET AL: "Hereditary chronic pancreatitis", BAILLIERE'S BEST PRACTICE AND RESEARCH. CLINICAL GASTROENTEROLOGY, BAILLIERE TINDALL, LONDRES, US, val. 22, nº 1, 17 de enero de 2008, páginas 115-130 desvelan mutaciones en el PRSS1 asociadas con pancreatitis; la mayoría de estas aumentan la conversión autocatalítica del tripsinógeno en tripsina activa. Algunas mutaciones incluyen la A16V, la O22G, la K23R, la N291, la N29T, la R122C. Se divulga una caracterización bioquímica de las mutaciones R122H y N291 usando tripsinógeno recombinante. La R122H da como resultado un aumento en la estabilidad y una autoactivación. La N291 aumenta la autoactivación del tripsinógeno.

50 THOMAS ZAUNER ET AL: "Highly Adaptable and Sensitive Protease Assay Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer", ANALYTICAL CHEMISTRY, val. 83, nº 19, 5 de septiembre de 2011, páginas 7356-7363, notifican el establecimiento de un ensayo simple de proteasa por transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (pro-FRET) para la determinación de las actividades de proteasa. En resumen, este ensayo se basa en la escisión de un sustrato peptídico de FRET, que da como resultado un drástico aumento en la fluorescencia del donante. Este ensayo era muy sensible y rápido para ambas proteasas.

55 El objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos para la determinación o la cuantificación de un analito con un aumento en el límite de detección o de cuantificación, particularmente mediante una disminución en la autoactivación del tripsinógeno.

60 El objetivo se alcanza mediante el asunto en cuestión de las reivindicaciones independientes de la presente invención.

65 La presente invención se basa en el hallazgo de que una modificación en la superficie del tripsinógeno humano puede dar lugar a la creación de una variante del tripsinógeno humano con una menor autoactivación. Particularmente, esta variante o mutante (tripsinógeno supercargado [sc]) se basa en unas cargas superficiales

modificadas en el sitio de la secuencia de activación. Este sitio está alejado del bolsillo de unión del sustrato para evitar cualquier efecto no deseado sobre la especificidad de sustrato.

5 Sin desear estar ligados a ninguna teoría, los inventores creen que la modificación de la carga superficial del tripsinógeno impide la unión de otra molécula de tripsinógeno, o de una tripsina, en el sitio de activación del tripsinógeno debido a la repulsión electrostática entre el tripsinógeno y la tripsina.

10 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90 % en la secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO 03, en el que el polipéptido comprende las sustituciones: el residuo de aminoácido E64 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral con carga positiva, particularmente un residuo de lisina o de arginina; el residuo de aminoácido K123 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, los residuos de aminoácido Y139 y/o D147 son sustituidos por un residuo de glutamina o de asparagina, y en el que el polipéptido se caracteriza adicionalmente por que un residuo de aminoácido seleccionado entre E16, E17 y/o E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y/o el residuo de aminoácido N18 es sustituido por un residuo de histidina, y/o el residuo de aminoácido R107 es sustituido por un residuo de lisina, y/o el residuo de aminoácido D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina, y en el que las posiciones de las sustituciones de aminoácido se refieren a la secuencia de aminoácidos del tripsinógeno 1 natural humano según la SEQ ID NO: 3; dicho polipéptido es escindible en un polipéptido que tiene una actividad similar a la natural cuando se compara con la tripsina 1 humana, que es la forma madura del tripsinógeno 1 humano (SEQ ID NO 3), dicho polipéptido no muestra una autoactivación significativa.

25 Una actividad enzimática similar a la natural en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una actividad enzimática que iguala en al menos el 80 %, el 90 % o el 95 % a la actividad enzimática de la tripsina natural humana, particularmente con una especificidad de sustrato similar cuando se compara con la tripsina natural humana.

30 En algunas realizaciones, el E16 y el E17 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática. En algunas realizaciones, el E16 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática.

En algunas realizaciones, el E17 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática.

35 En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la N18 es sustituida por un residuo de histidina. En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

40 En algunas realizaciones, el E17 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la N18 es sustituida por un residuo de histidina. En algunas realizaciones, el E17 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas realizaciones, el E17 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

45 En algunas realizaciones, el E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la N18 es sustituida por un residuo de histidina. En algunas realizaciones, el E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas realizaciones, el E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

50 En algunas realizaciones, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas realizaciones, la N18 es sustituida por un residuo de histidina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

55 En algunas realizaciones, la R107 es sustituida por un residuo de lisina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

60 En algunas realizaciones, todos los E16, E17 y E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática.

65 En algunas realizaciones, el E16 y el E17 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la N18 es sustituida por un residuo de histidina. En algunas realizaciones, el E16 y el E17 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas



residuo de histidina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

5 En algunas realizaciones, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral con carga positiva y el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática. En algunas realizaciones, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral con carga positiva y el E17 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática. En algunas realizaciones, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina y el E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática.

15 En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina y el E17 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática. En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina y el E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática. En algunas realizaciones, el E16 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la R107 es sustituida por un residuo de lisina, el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina, y la N18 es sustituida por un residuo de histidina.

25 En algunas realizaciones, el E16, el E17 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, y la R107 es sustituida por un residuo de lisina. En algunas realizaciones, el E16, el E17 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la N18 es sustituida por un residuo de histidina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

30 En algunas realizaciones, el E16 y el E17 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

35 En algunas realizaciones, el E16 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

40 En algunas realizaciones, el E142 y el E17 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la N18 es sustituida por un residuo de histidina, la R107 es sustituida por un residuo de lisina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

En algunas realizaciones, el E16, el E17 y el E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, la R107 es sustituida por un residuo de lisina y el D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en, o comprende, una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por una sustitución de aminoácido seleccionada entre la E16A, la E17A, la N18H, la E64K, la R107K, la K123L, la D138K, la Y139N, la E142L y la D147N.

50 Una sustitución de aminoácido E16A en el contexto de la presente memoria descriptiva significa que el residuo de glutamato en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos del tripsinógeno 1 natural humano (SEQ ID NO 3) es sustituido por un residuo de alanina. Esto debe aplicarse igualmente a las otras sustituciones de aminoácido descritas anteriormente.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por una sustitución de aminoácido seleccionada entre la E16A, la E17A, la N18H, la D138K, la E142L y la R107K.

60 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A y E17A. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A y E142L. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E17A y E142L.

65





Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido N18H, R107K, D138K y E17A. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido N18H, R107K, D138K y E142L.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, R107K, D138K y E17A. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, R107K, D138K y E142L. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, R107K, D138K y N18H.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, E142L, N18H y R107K. En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, E142L, N18H y D138K.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, N18H, R107K y D138K.

En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, E142L, N18H, R107K y D138K.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E17A, E142L, N18H, R107K y D138K.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E64K, K123L, Y139N y D147N, y en el que la variante se caracteriza adicionalmente por las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, E142L, R107K y D138K.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano que se caracteriza por las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, N18H, E64K, R107K, K123L, D138K, Y139N, E142L y D147N.

En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en una variante del tripsinógeno 1 humano (SEQ ID NO 3) que muestra una identidad en la secuencia de al menos el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % con el tripsinógeno 1 humano (SEQ ID NO 03).

45 En una realización, el polipéptido consiste en una variante caracterizada por la SEQ ID NO 01.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos, en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

50 En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos consiste en, o comprende, la SEQ ID NO 02 o la SEQ ID NO 18.

55 Cuando se hace referencia en el presente documento a un polipéptido caracterizado por una secuencia en particular, se entiende que dicha referencia también engloba los polipéptidos que tienen una función idéntica a la secuencia en particular, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de las sustituciones de aminoácido descritas anteriormente, y que muestra una identidad en la secuencia de al menos el 90 % o el 95 % con esa secuencia en concreto.

60 Asimismo, cuando se hace referencia en el presente documento a una secuencia de ácidos nucleicos caracterizada por una secuencia en particular, se entiende que dicha referencia también engloba las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que tienen una función idéntica a la del polipéptido codificado por la secuencia en particular, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de las sustituciones de aminoácido descritas anteriormente.

65 En el contexto de las presentes especificaciones, los términos "identidad en la secuencia" y "porcentaje de identidad en la secuencia" se refieren a los valores determinados mediante la comparación de dos secuencias alineadas. Los métodos de alineación de las secuencias para su comparación son bien conocidos en la materia. La alineación de secuencias para su comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y

Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci. 85: 2444 (1988) o mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos que incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA. Salvo que se indique de otro modo, los valores de la identidad en la secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido usando el conjunto de programas informáticos BLAST usando los parámetros por defecto (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). El soporte lógico para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible al público, por ejemplo, a través del National Center for Biotechnology-Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Un ejemplo para la comparación de secuencias de aminoácidos es el algoritmo BLASTP, que usa los parámetros por defecto tales como: umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 3; coincidencias máximas en un intervalo de interrogación: 0; Matriz: BLOSUM62; coste por hueco: existencia 11, extensión 1; ajustes de la composición: ajuste de la matriz de puntuación de la composición condicional. Uno de dichos ejemplos para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos es el algoritmo BLASTN, que usa los parámetros por defecto: umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 28; coincidencias máximas en un intervalo de interrogación: 0; puntuaciones de coincidencia/no coincidencia: 1.-2; coste por hueco: lineal

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según el segundo aspecto de la invención.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos es un transgen para la célula hospedadora.

El término "transgen" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido transferida a la célula hospedadora desde otro organismo.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos está comprendida en un vector operable en la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, el vector consiste en, o comprende, una secuencia de ácidos nucleicos caracterizada por la SEQ ID NO 18.

El término "vector operable en la célula hospedadora" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula de ADN que puede ser usada como vehículo para transportar una secuencia de ácidos nucleicos foránea en la célula hospedadora, en el que dicha molécula de ADN puede ser replicada en la célula hospedadora y en el que la secuencia de ácidos nucleicos foránea comprendida en la molécula de ADN puede ser expresada en la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo formado por un miembro del género *Escherichia* tal como *E. coli*, un miembro del género *Saccharomyces* tal como *S. cerevisiae*, un miembro del género *Schizosaccharomyces* tal como *S. pombe*, un miembro del género *Pichia* tal como *P. pastoris*, un miembro del género *Aspergillus* tal como *A. niger*, un miembro del género *Bacillus* tal como *B. subtilis* y una célula de mamífero en un cultivo celular, tal como una célula CHO (de ovario de hámster chino) o una célula HEK (de riñón embrionario humano) 293.

Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para la elaboración de un polipéptido según el primer aspecto de la invención, en el que el método comprende el uso de una célula hospedadora según el cuarto aspecto de la invención.

En algunas realizaciones, el método comprende:

- una etapa de propagación, en la que se propaga la célula hospedadora, y
- una etapa de expresión, en la que la secuencia de ácidos nucleicos es expresada en la célula hospedadora, produciendo un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

El polipéptido puede estar ubicado intracelularmente, o puede ser transportado al periplasma o el espacio extracelular, particularmente mediante el uso de un péptido de señalización N- o C-terminal unido al polipéptido.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para la cuantificación de un analito, en el que el método comprende las etapas de:

- proporcionar un volumen de reacción,
- añadir al volumen de reacción en una primera etapa, un analito y un primer ligando que es capaz de unirse específicamente al analito con una constante de disociación igual o inferior a  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l o  $10^{-9}$  mol/l,
- añadir al volumen de reacción en una segunda etapa un segundo ligando capaz de unirse específicamente al primer ligando con una constante de disociación igual o inferior a  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l o  $10^{-9}$  mol/l, en el que el segundo ligando comprende un primer polipéptido que tiene una actividad proteolítica,

- añadir al volumen de reacción, en una tercera etapa, un polipéptido precursor, en el que el polipéptido precursor es escindible por el primer polipéptido en un segundo polipéptido y un sustrato peptídico del segundo polipéptido que comprende un primer compañero de FRET luminiscente y un segundo compañero de FRET, en el que el primer compañero de FRET y el segundo compañero de FRET son capaces de interactuar de tal forma que la señal luminiscente del primer compañero de FRET cambia con la aproximación espacial del primer compañero de FRET y el segundo compañero de FRET, y en el que el sustrato peptídico es escindible por el segundo polipéptido entre el primer compañero de FRET y el segundo compañero de FRET, en el que la escisión del sustrato peptídico da lugar a un cambio en la aproximación espacial del primer y el segundo compañero de FRET,
- la cuantificación de la cantidad de analito mediante la medición de la luminiscencia del primer compañero de FRET y/o del segundo compañero de FRET,

caracterizado por que el polipéptido precursor es un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

El término "un primer polipéptido que tiene una actividad proteolítica" se refiere particularmente a una proteasa o a un polipéptido que comprende dicha proteasa, en el que el polipéptido precursor es un sustrato de la proteasa y en el que particularmente la proteasa escinde el polipéptido precursor en un péptido de activación y el segundo polipéptido.

El término "sustrato peptídico escindible por el segundo polipéptido entre el primer compañero de FRET y el segundo compañero de FRET" significa particularmente que el sustrato peptídico es un sustrato del segundo polipéptido, y que el primer compañero de FRET está unido a un primer residuo de aminoácido del sustrato peptídico, y el segundo compañero de FRET está unido a un segundo residuo de aminoácido del sustrato peptídico, en el que el primer residuo de aminoácido y el segundo residuo de aminoácido están conectados por al menos un enlace peptídico, y en el que este enlace peptídico específicamente es escindido por el segundo polipéptido.

El término "sustrato" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a un compuesto que está unido a, y es convertido por, una enzima, por ejemplo, una proteasa, particularmente mediante el primer polipéptido o el segundo polipéptido descrito anteriormente, con una  $K_M$  no mayor de 100 mmol/l, de 50 mmol/l, de 20 mmol/l, de 10 mmol/l, de 5 mmol/l, de 1 mmol/l de o de 0,1 mmol/l.

Una ventaja del uso del polipéptido según la invención es que, debido a la disminución en la autoactivación del polipéptido, la señal de fondo del método de la invención disminuye, dando como resultado una reducción en el límite de detección o de cuantificación.

Un ligando según cualquier aspecto o realización de la invención puede ser cualquier molécula que se une a una molécula objetivo o analito con una elevada afinidad y especificidad. Dicho ligando puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula similar a un anticuerpo o una molécula de aptámero de un ácido nucleico de entre 10 y 75 nucleótidos de longitud, cualquiera de los cuales se une a la molécula objetivo.

Elevada afinidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la constante de disociación de la unión del ligando con la molécula objetivo, en la que la constante de disociación es de  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l de o  $10^{-9}$  mol/l de o menos, y en la que el ligando no se une a las moléculas de control, por ejemplo, proteínas, con unas características estructurales no relacionadas. Las moléculas de control son, a modo de ejemplo no limitante, proteínas plasmáticas tales como albúminas, globulinas, lipoproteínas, fibrinógenos, protrombina, proteínas en fase aguda, marcadores tumorales tales como CEA, CA19-9 o AFP y transferrina.

Elevada especificidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la proporción entre los objetivos o analitos apropiadamente detectados y la suma de todos los compuestos o sustancias detectadas, en la que la proporción es del 80 %, del 85 %, del 90 %, del 95 %, del 99 % o del 99,9 %.

Un fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, que es el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un fragmento variable de cadena única, que es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo conectadas por un péptido conector. Una molécula similar a un anticuerpo puede ser una proteína repetitiva, tal como una proteína repetitiva de anquirina diseñada (Molecular Partners, Zúrich).

Los ligandos adecuados según el anterior aspecto de la invención también pueden ser desarrollados mediante métodos evolutivos tales como una expresión en fago, una expresión en ribosoma o un SELEX, en los que el polipéptido o los oligonucleótidos se seleccionan según su capacidad de unión a un objetivo de interés.

Adicionalmente, la afinidad de unión de un ligando identificado puede mejorarse mediante ciclos de evolución de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia de nucleótidos, y la selección de los inhibidores evolucionados puede efectuarse basándose en la afinidad requerida.

El término “analito” en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a un compuesto o a una sustancia de interés que es el objetivo de un análisis.

5 En algunas realizaciones, el primer polipéptido se caracteriza por un valor de  $K_m$  no mayor de 10 mmol/l para el polipéptido precursor como sustrato.

10 En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET se acopla al N terminal o al C terminal del sustrato peptídico. En algunas realizaciones, el segundo compañero de FRET se acopla al N terminal o al C terminal del sustrato peptídico. En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET se acopla al N terminal del sustrato peptídico y el segundo compañero de FRET se acopla al C terminal del sustrato peptídico. En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET se acopla al C terminal del sustrato peptídico y el segundo compañero de FRET se acopla al N terminal del sustrato peptídico.

15 En algunas realizaciones, el analito se selecciona entre un péptido, un polipéptido, un ácido nucleico y una molécula pequeña tal como un lípido, un azúcar o un metabolito.

20 En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo ligando se selecciona entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula similar a un anticuerpo y una molécula de aptámero de un ácido nucleico de entre 10 y 75 nucleótidos de longitud.

25 En algunas realizaciones, el sustrato peptídico es o comprende un péptido caracterizado por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO 06, la SEQ ID NO 07, la SEQ ID NO 08, la SEQ ID NO 09, la SEQ ID NO 10, la SEQ ID NO 11, la SEQ ID NO 12, la SEQ ID NO 13, la SEQ ID NO 14, la SEQ ID NO 15, la SEQ ID NO 16 y la SEQ ID NO 17.

En algunas realizaciones, el primer polipéptido que tiene una actividad proteolítica es o comprende la cadena ligera catalítica de la enteropeptidasa humana (Uniprot E9PG70) o un polipéptido caracterizado por la SEQ ID NO 05 (variante supercargada de la enteropeptidasa humana).

30 En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET es un colorante que comprende un átomo de un lantánido. En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET es un colorante que comprende un átomo de europio o un átomo de terbio.

35 En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET se selecciona entre la fluoresceína (CAS n° 2321-07- 5) y EuL[H] ([2-[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-2-[carboxi-metil-2-oxo-2-[4-[2-(1,10-fenantrolin-2-il)etini]anilino]etil]amino]etil]amino] acetato] de Eu (III)).

40 En algunas realizaciones, el segundo compañero de FRET es Atto612Q, Cy5 (ácido 6-[3,3-dimetil-2-[(1E,3E,5E)-5-(1,3,3-trimetilindolin-2-iliden)penta-1,3-dienil]indol-1-io-1-il]hexanoico) o TAMRA (carboxi-tetrametilrodamina).

En algunas realizaciones, el segundo compañero de FRET no es luminiscente.

45 En una realización, el segundo compañero de FRET es un inactivador oscuro, particularmente un inactivador de agujero negro tal como BHQ-O (Biosearch Technologies, Estados Unidos), BHQ-1 (Biosearch Technologies, Estados Unidos), BHQ-2 (Biosearch Technologies, Estados Unidos), BHQ-3 (Biosearch Technologies, Estados Unidos) o BHQ-10 (2-[(E)-[4-[(4-hidroxi-4-oxo-butil)-metil-amino]fenil]azo]-5-[(E)-(4-oxoniosulfonilfenil)azo]bencensulfonato), Dabysyl (ácido dimetilaminoazobencensulfónico), un inactivador Qxl tal como QXL 490 (AnaSpec, Inc., Estados Unidos), QXL 570 (AnaSpec, Inc., Estados Unidos), QXL 610 (AnaSpec, Inc., Estados Unidos), QXL 670 (AnaSpec Inc., Estados Unidos) o QXL 680 (AnaSpec, Inc., Estados Unidos), Iowa black FQ (Integrated DNA Technologies, Inc., Estados Unidos), Iowa black RQ (Integrated DNA Technologies, Inc., Estados Unidos), IRDye QC-1 (LI-COR Biosciences GmbH, Alemania) o un Eclipse Dark Quencher (Eurogentec Deutschland GmbH, Alemania).

55 En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET es EuL[H] y el segundo compañero de FRET es BHQ-10. En algunas realizaciones, el EuL[H] se acopla al N terminal del sustrato péptido y el BHQ-10 se acopla al C terminal del sustrato péptido.

60 En algunas realizaciones, el primer compañero de FRET es fluoresceína y el segundo compañero de FRET es la TAMRA. En algunas realizaciones, la TAMRA se acopla al N terminal del sustrato péptido y la fluoresceína se acopla al C terminal del sustrato péptido.

65 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de las cuales pueden extraerse realizaciones y ventajas adicionales. Se entiende que estos ejemplos ilustran la invención, pero no limitan su ámbito.

Siempre que en el presente documento se planteen alternativas para características separables individuales tales como, por ejemplo, una variante o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante, como "realizaciones", debe entenderse que dichas alternativas pueden ser combinadas libremente para formar las realizaciones de la invención individuales divulgadas en el presente documento.

- 5
- Descripción de las figuras**
- La Fig. 1 muestra el principio de un método de la invención.  
 La Fig. 2 muestra una variante esquemática del tripsinógeno humano con una menor autoactivación.  
 10 La Fig. 3 muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos del polipéptido de la invención y el tripsinógeno natural humano, en la que los aminoácidos modificados están destacados en negrita.  
 La Fig. 4 muestra una comparación de las secuencias de ácidos nucleicos del polipéptido de la invención y el tripsinógeno natural humano, en la que los ácidos nucleicos modificados están destacados en negrita.  
 La Fig. 5 muestra la cinética de la autoactivación del PRSS1 sc en comparación con el PRSS1 natural, en la que la actividad de la tripsina está representada frente al tiempo de incubación.  
 15 La Fig. 6 muestra la cinética de la activación del PRSS1 sc- y del PRSS1 natural después de la incubación con enteropeptidasa humana (hEPI-Sc-C112S), en la que la actividad de la tripsina está representada frente al tiempo de incubación.  
 La Fig. 7 muestra los geles de SDS-PAGE de la autoactivación del PRSS1-WT y del PRSS1-sc.  
 20 La Fig. 8 muestra la cinética de la autoactivación del PRSS1 sc en comparación con el PRSS1 natural, en la que la intensidad de la fluorescencia está representada frente al tiempo de incubación.  
 La Fig. 9 muestra la cinética de la activación del PRSS1 sc- y del PRSS1 natural después de la incubación con enteropeptidasa humana (hEPI-Sc-C112S), en la que la intensidad de la fluorescencia está representada frente al tiempo de incubación.  
 25 La Fig. 10 muestra un ELISA indirecto contra la interleucina 6 humana (IL-6), en el que la intensidad de la fluorescencia está representada frente a la concentración de interleucina 6.  
 La Fig. 11 muestra la cinética de la autoactivación del PRSS1 E64K en comparación con el PRSS1 natural, en la que la actividad de la tripsina está representada frente al tiempo de incubación.

### 30 Ejemplos

#### Ejemplo 1: elaboración de la variante supercargada del tripsinógeno humano

35 Variante supercargada del tripsinógeno 1 humano elaborada en *E coli* BL21. En resumen, se propagaron células de *E coli* BL21 que comprenden un vector de expresión caracterizado por la SEQ ID NO 17 en un medio TB con 30 µg/ml de kanamicina a 37 °C hasta que se alcanzó una DO600 de entre 0,8 y 1. A continuación, se indujo la expresión mediante la adición de IPTG 1 mM. Paralelamente a esto se añadió glucosa a una concentración final del 1 % (p/v). Después, las células se incubaron durante 18 h a 25 °C. Después de la incubación, las células se recogieron, y los sedimentos celulares resultantes se almacenaron a -20 °C.

40 Para la preparación, las células se resuspendieron en tampón de lisis celular (1 mmol/l de EDTA; 100 mmol/l de Tris/HCl; pH 7,0). A la suspensión celular se añadieron 5 mg de lisozima. Después de esto, la concentración de MgCl<sub>2</sub> de la suspensión se ajustó a 3 mmol/l y se añadió DNasa I a una concentración final de 10 µg/ml. La suspensión se incubó después a 24 °C durante 30 min.

45 Después, las células se rompieron mecánicamente en un homogeneizador a alta presión, en el que la ruptura celular se llevó a cabo tres veces a una presión de aproximadamente 1000 bar. Las células rotas se incubaron durante 30 min a 24 °C y se centrifugaron.

50 Los cuerpos de inclusión que comprenden la variante supercargada se prepararon como sigue a partir de la fracción insoluble de la ruptura celular: los cuerpos de inclusión se resuspendieron en tampón de lavado IB I (20 mmol/l de EDTA a pH 8,0; 500 mmol/l de NaCl; Triton X-100 al 2 %), se agitaron durante 30 min a la temperatura ambiente y se centrifugaron 30 min a 20.000 g. El sedimento resultante se lavó de nuevo con tampón de lavado IB I y dos veces con lavado IB (20 mmol/l de EDTA; 100 mmol/l de Tris/HCl; pH 7,0) consecuentemente, pero sin agitación.

55 Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 4 mmol/l de guanidinio, 100 mmol/l de TRIS HCl y 5 mmol/l de EDTA, a pH 8,0, se redujeron con 3 mmol/l de ditiotretol y se replegaron a través de un método de dilución rápida en un tampón de replegado (0,7 mmol/l de arginina, 1 mmol/l de EDTA, 3 mmol/l de glutatión reducido, 3 mmol/l de glutatión oxidado, a pH 8,6). La variante supercargada replegada se purificó posteriormente a través de una columna de afinidad con ecotina.

#### 60 Ejemplo 2: caracterización de la variante supercargada del tripsinógeno humano

65 El tripsinógeno humano mutante con una menor autoactivación se basa en la introducción de aminoácidos cargados en la superficie de la proteína cerca del sitio de activación (fig. 2). El PRSS1 sc (SEQ ID NO 01) no muestra una autoactivación significativa, según se muestra en la fig. 3 (la activación del tripsinógeno (2 µM) se produjo con 10

nmol/l de tripsina en 100 mmol/l de Tris/HCl a pH 8, 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>. El sustrato CBZ (carbobenzoxi)-GPR-pNA (para-nitroanilina) se incubó durante 5 min a 25 °C y en la figura 6 se incubó tripsinógeno (100 nmol/l) en 100 mmol/l de Tris a pH 8,0 durante 2 horas a 37 °C. Como sustrato se usó un péptido con la secuencia TAMRA-GSRC (Fluoresceína)-NH<sub>2</sub> (péptido 7, SEQ ID NO 10).

Un análisis mediante una electroforesis en gel con SDS mostró unos resultados similares, según se muestra en la fig. 5 (SDS-PAGE de la autoactivación del PRSS1-WT y del PRSS1-sc. La activación del tripsinógeno (2 μmol/l) se produjo con 10 nmol/l de tripsina en 100 mmol/l de Tris/HCl a pH 8, 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>. Se usó una tinción de plata para la visualización).

Ambas versiones del PRSS1 pueden ser activadas a unos niveles similares, aunque el PRSS1 sc muestra un perfil reactivación ligeramente más lento según se muestra en la fig. 4 (la activación del tripsinógeno (2 μmol/l) se produjo con 1 nmol/l de hEPI-sc-C112S en 100 mmol/l de Tris/HCl a pH 8, 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>. El sustrato CBZ-GPR-pNA se incubó durante 5 min a 25 °C) y fig. 7 (la activación del tripsinógeno (100 nmol/l) se produjo con 100 pmol/l de hEPI-sc-C112S en 100 mmol/l de Tris a pH 8,0 durante 2 horas a 37 °C. Como sustrato se usó un péptido con la secuencia TAMRA-GSRC (Fluoresceína)-NH<sub>2</sub> (péptido 7, SEQ ID NO 10)).

La Tabla 1 muestra la cinética enzimática ( $K_M$ ,  $K_{cat}$ ) del PRSS1 sc en comparación con el PRSS1 natural. Ambas enzimas fueron activadas por la enteropeptidasa humana (hEPI-Sc-C112S) durante 200 min a 37 °C en 100 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>. Los ensayos se llevaron a cabo en 100 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0) 1 mmol/l de CaCl<sub>2</sub> y entre 10 μmol/l y 1000 μmol/l de CBZ-GPR-pNA a la temperatura ambiente. La reacción se inició mediante la adición de las variantes del PRSS1 (12,5 ng) y se monitorizó de forma continua durante 5 min mediante el aumento de la absorbancia a 405 nm (coeficiente de extinción para la p-nitroanilina,  $\epsilon = 10092$  l/mol/cm).

	$V_{m\acute{a}x}$ [μmol/l/min]	$K_M$ [μmol/l]	$k_{cat}$ [S <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [l/μmol/s]
PRSS1-WT	100,8 ± 4,4	78,0 ± 12,2	324,1 ± 13,8	4,7 ± 0,5
PRSS1-sc	152,3 ± 5,9	129,8 ± 8,4	489,0 ± 18,9	3,7 ± 0,3

Tabla 1.

La cinética de autoactivación del PRSS1 E64K no es significativamente diferente de la del PRSS1 natural. Esto significa que la mutación E64K por sí sola no es responsable de la reducida autoactivación del scPRSS1, pero contribuye al cambio global en la carga superficial de la proteína, y por lo tanto contribuye a la reducida autoactivación observada en el PRSS1-sc (Fig. 11).

### Ejemplo 3: ensayo en sándwich con la variante supercargada del tripsinógeno humano

La Fig. 1 muestra el principio de un ensayo de la invención. En este ensayo se une un analito mediante un anticuerpo primario, que es específico para el analito. Después de una etapa de lavado, el anticuerpo primario es unido por un anticuerpo secundario que está acoplado covalentemente a la enteropeptidasa (E1). Entonces, de nuevo después de una etapa de lavado adicional, se añade al ensayo una mezcla de tripsinógeno inactivo y un péptido de FRET (el péptido 7, SEQ ID NO 10, con fluoresceína como colorante donante y TAMRA como colorante aceptor), en el que la enteropeptidasa unida al anticuerpo activa el tripsinógeno inactivo (E2 inactivo) en tripsina activa, y la tripsina escinde después el péptido FRET, dando como resultado un aumento en la señal del colorante donante (la fluoresceína).

La Fig. 10 muestra los resultados de dicho ELISA. Se detectó un anticuerpo primario contra la IL-6 con un anticuerpo secundario que estaba marcado con la cadena ligera de la enteropeptidasa humana sc C112S. El sustrato peptídico FRET fue escindido por el PRSS1-WT o por el PRSS1-sc. El límite de detección con el PRSS1-sc es al menos cinco veces menor que con el PRSS1-WT. Esto es debido a la menor señal de fondo del PRSS1-sc. El ensayo se llevó a cabo en 100 mmol/l de TRIS a pH 8,0. Después de la unión del anticuerpo secundario, se añadieron 100 nmol/l de tripsinógeno (WT o sc) y 100 nmol/l del sustrato peptídico 7 [TAMRA-GSRC (Fluoresceína)-NH<sub>2</sub> (el péptido 7, SEQ ID NO 10)] y se incubó durante 60 min a 37 °C. Después se registró la intensidad de la fluorescencia resultante.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universität Leipzig

<120> tripsinógeno humano con una autoactivación reducida y su uso en un inmunoensayo

<130> ule106wo

<150> EP13187194.9

<151> 02-10-2013

<160> 18

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PRSS1-sc, una variante supercargada del tripsinógeno 1 humano

15 <400> 1

Met Gly Phe Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Asn Cys Ala  
1 5 10 15

Ala His Ser Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe  
20 25 30

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Glu Gln Trp Val Val Ser Ala Gly His  
35 40 45

Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Lys  
50 55 60

Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Arg  
65 70 75 80

His Pro Gln Tyr Asp Arg Lys Thr Leu Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile  
85 90 95

Lys Leu Ser Ser Arg Ala Val Ile Asn Ala Lys Val Ser Thr Ile Ser  
100 105 110

Leu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Thr Gly Thr Leu Cys Leu Ile Ser Gly  
115 120 125

Trp Gly Asn Thr Ala Ser Ser Gly Ala Lys Asn Pro Asp Leu Leu Gln  
130 135 140

Cys Leu Asn Ala Pro Val Leu Ser Gln Ala Lys Cys Glu Ala Ser Tyr

ES 2 670 532 T3

145		150		155		160
Pro Gly Lys Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Val Gly Phe Leu Glu Gly		165		170		175
Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn	180		185		190	
Gly Gln Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Lys	195		200		205	
Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Tyr Asn Tyr Val Lys Trp Ile	210		215		220	
Lys Asn Thr Ile Ala Ala Asn Ser	225		230			

5 <210> 2  
 <211> 699  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> PRSS1-sc, ADN que codifica una variante supercargada del tripsinógeno 1 humano

<400> 2

atgggctttg atgatgatga caagatcggt gggggctaca actgtgcggc gcattctgtc	60
ccctaccagg tgtccctgaa ttctggctac cacttctgtg gtggctccct catcaacgaa	120
cagtgggtgg taccagcagg ccaactgctac aagtcccga tccaggtgag actgggagag	180
cacaacatca aagtcctgga ggggaatgag cagttcatca atgcagccaa gatcatccgc	240
cacccccaat acgacaggaa gactctgaac aatgacatca tgtaatacaa gctctcctca	300
cgtgcagtaa tcaacgccaa agtgtccacc atctctctgc ccaccgccc tccagccact	360
ggcacgctgt gcctcatctc tggctggggc aacctgcga gctctgggc caaaaacca	420
gacctgctgc agtgcoctgaa cgctcctgtg ctgagccagg ctaagtgtga agcctcctac	480
cctggaaaga ttaccagcaa catgttctgt gtgggcttcc ttgagggagg caaggattca	540
tgtcaggggtg attctggtgg ccctgtggtc tgcaatggac agtccaagg agttgtctcc	600
tggggatgatg gctgtgcccc gaagaacaag cctggagtct acaccaagg ctacaactat	660
gtgaaatgga ttaagaacac catagctgcc aatagctaa	699

15 <210> 3  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 3

ES 2 670 532 T3

Met Gly Phe Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Asn Cys Glu  
 1 5 10 15

Glu Asn Ser Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe  
 20 25 30

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Glu Gln Trp Val Val Ser Ala Gly His  
 35 40 45

Cys Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu His Asn Ile Glu  
 50 55 60

Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Arg  
 65 70 75 80

His Pro Gln Tyr Asp Arg Lys Thr Leu Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile  
 85 90 95

Lys Leu Ser Ser Arg Ala Val Ile Asn Ala Arg Val Ser Thr Ile Ser  
 100 105 110

Leu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Thr Gly Thr Lys Cys Leu Ile Ser Gly  
 115 120 125

Trp Gly Asn Thr Ala Ser Ser Gly Ala Asp Tyr Pro Asp Glu Leu Gln  
 130 135 140

Cys Leu Asp Ala Pro Val Leu Ser Gln Ala Lys Cys Glu Ala Ser Tyr  
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Ile Thr Ser Asn Met Phe Cys Val Gly Phe Leu Glu Gly  
 165 170 175

Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn  
 180 185 190

Gly Gln Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Lys  
 195 200 205

Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Tyr Asn Tyr Val Lys Trp Ile  
 210 215 220

Lys Asn Thr Ile Ala Ala Asn Ser  
 225 230

<210> 4  
 <211> 699  
 <212> ADN

ES 2 670 532 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

atgggctttg atgatgatga caagatcgtt gggggctaca actgtgagga gaattctgtc      60
ccctaccagg tgtccctgaa ttctggctac cacttctgtg gtggctccct catcaacgaa    120
cagtgggtgg tatcagcagg ccaactgctac aagtcccgca tccagggtgag actgggagag    180
cacaacatcg aagtcctgga ggggaatgag cagttcatca atgcagccaa gatcatccgc    240
caccccaat  acgacaggaa gactctgaac aatgacatca tgtaatacaa gctctcctca    300
cgtgcagtaa tcaacgcccg cgtgtccacc atctctctgc ccaccgccc tccagccact    360
ggcacgaagt gcctcatctc tggtgggggc aacctgcca gctctggcgc cgactacca    420
gacgagctgc agtgccctgga cgctcctgtg ctgagccagg ctaagtgtga agcctcctac    480
cctggaaaga ttaccagcaa catggtctgt gtgggcttcc ttgagggagg caaggattca    540
tgtcaggggtg attctgggtg cctgtgggtc tgcaatggac agctccaagg agttgtctcc    600
tgggggtgatg gctgtgcccc gaagaacaag cctggagtct acaccaaggt ctacaactat    660
5  gtgaaatgga ttaagaacac catagctgcc aatagctaa      699

```

<210> 5

<211> 235

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hEPI-sc-C112S, una variante supercargada de la enteropeptidasa humana

15 <400> 5

```

Ile Val Gly Gly Ser Asp Ala Lys Glu Gly Ala Trp Pro Trp Val Val
1           5           10           15

Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Arg Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Val Ser
20           25           30

Ser Asp Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Val Tyr Gly Arg Asn Leu
35           40           45

Glu Pro Ser Lys Trp Thr Ala Ile Leu Gly Leu His Met Lys Ser Asn
50           55           60

Leu Thr Ser Pro Gln Thr Val Pro Arg Leu Ile Asp Glu Ile Val Ile
65           70           75           80

Asn Pro His Tyr Asn Arg Arg Arg Lys Asp Asn Asp Ile Ala Met Met
85           90           95

```

ES 2 670 532 T3

His Leu Glu Phe Lys Val Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Gln Pro Ile Ser  
 100 105 110  
 Leu Pro Glu Glu Asn Gln Val Phe Pro Pro Gly Arg Asn Cys Ser Ile  
 115 120 125  
 Ala Gly Trp Gly Thr Val Val Tyr Gln Gly Thr Thr Ala Asp Ile Leu  
 130 135 140  
 Gln Glu Ala Asp Val Pro Leu Leu Ser Asn Glu Arg Cys Gln Gln Gln  
 145 150 155 160  
 Met Pro Glu Tyr Asn Ile Thr Glu Asn Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu  
 165 170 175  
 Glu Gly Gly Ile Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met  
 180 185 190  
 Cys Gln Glu Asn Asn Arg Trp Phe Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly  
 195 200 205  
 Tyr Glu Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Ser  
 210 215 220  
 Arg Phe Thr Glu Trp Ile Gln Ser Phe Leu His  
 225 230 235

- 5 <210> 6
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> péptido 3, un sustrato de la tripsina 1 humana
  
- <400> 6
- Gly Arg Ala Ser Cys
- 1 5
  
- 15 <210> 7
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> péptido 4, un sustrato de la tripsina 1 humana
  
- <400> 7
- Gly Arg Ala Ser Thr Cys
- 1 5
  
- 25 <210> 8
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido 5, un sustrato de la tripsina 1 humana  
  
 <400> 8  
**Gly Arg Ala Ser Thr Ser Cys**  
 5     1                             5  
  
 <210> 9  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 10     <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido 6, un sustrato de la tripsina 1 humana  
  
 15     <400> 9  
**Gly Arg Cys**  
 1  
  
 <210> 10  
 <211> 4  
 20     <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido 7, un sustrato de la tripsina 1 humana  
 25  
 <400> 10  
**Gly Ser Arg Cys**  
 1  
  
 <210> 11  
 <211> 5  
 30     <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> péptido 8, un sustrato de la tripsina 1 humana  
 35  
 <400> 11  
**Gly Ser Arg Ala Cys**  
 1                             5  
  
 40     <210> 12  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45     <220>  
 <223> péptido 9, un sustrato de la tripsina 1 humana  
  
 <400> 12  
**Gly Ser Arg Ala Ser Cys**  
 50     1                             5  
  
 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> péptido 10, un sustrato de la tripsina 1 humana  
  
 <400> 13

**Gly Ser Arg Ala Ser Thr Cys**  
**1 5**

5 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido 11, un sustrato de la tripsina 1 humana

<400> 14  
**Gly Ser Ala Thr Arg Ala Ser Thr Glu Lys Cys**  
**1 5 10**

15 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> péptido 12, un sustrato de la tripsina 1 humana

<400> 15  
**Gly Pro Ala Arg Leu Ala Ile Ser Glu Cys**  
**1 5 10**

25 <210> 16  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> péptido 13, un sustrato de la tripsina 1 humana

<400> 16  
**Gly Pro Arg**  
**1**

35 <210> 17  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> péptido 14, un sustrato de la tripsina 1 humana

<400> 17  
**Ser Arg Ala Lys**  
**1**

45 <210> 18  
 <211> 5932  
 <212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> pET28 vector que codifica la variante supercargada del tripsinógeno 1 humano

55 <400> 18

ES 2 670 532 T3

tggcgaatgg gacgcgcctt gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcgt cctttcgttt tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tccgggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat	600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa	660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggctctgcg attccgactc	720
gtccaacatc aatacaacct attaatcttc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga	780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc	840
agacttgttc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac	900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgcctg ttaaaaggac	960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgcg tcaacaatat	1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccc gggatcgcag	1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca	1140

ES 2 670 532 T3

taaattccgt	cagccagttt	agtctgacca	tctcatctgt	aacatcattg	gcaacgctac	1200
ctttgccatg	tttcagaaac	aactctggcg	catcgggctt	ccatacaat	cgatagattg	1260
tcgcacctga	ttgcccgaca	ttatcgcgag	cccatttata	cccatataaa	tcagcatcca	1320
tgttgaatt	taatcgcggc	ctagagcaag	acgtttcccg	ttgaatatgg	ctcataacac	1380
cccttgatt	actgtttatg	taagcagaca	gttttattgt	tcatgaccaa	aatcccttaa	1440
cgtagagttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	1500
gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	1560
gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggtctcagc	1620
agagcgcaga	taccaaatac	tgtccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	1680
aactctgtag	caccgcctac	atacctcgtc	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	1740
agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	1800
cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	aacgacctac	1860
accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	1920
aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcag	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	1980
ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	2040
cgtcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	2100
gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	2160
tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgcgcg	2220
agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagt	agcagaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	2280
tattttctcc	ttacgcatct	gtgcggtatt	tcacaccgca	tatatggtgc	actctcagta	2340
caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	agtatacaact	ccgctatcgc	tacgtgactg	2400
ggtcatggct	gcgccccgac	acccgccaac	acccgctgac	gcgcccctgac	gggttgtct	2460
gctccccgca	tcgcttaca	gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	2520
gttttcaccg	tcatacaccga	aacgcgcgag	gcagctgcgg	taaagctcat	cagcgtggtc	2580
gtgaagcgat	tcacagatgt	ctgcctgttc	atccgcgtcc	agctcgttga	gtttctccag	2640
aagcgttaat	gtctggcttc	tgataaagcg	ggccatgtta	agggcggttt	ttcctgttt	2700
ggtcactgat	gcctccgtgt	aagggggatt	tctgttcatg	ggggtaatga	taccgatgaa	2760
acgagagagg	atgctcacga	tacgggttac	tgatgatgaa	catgcccggt	tactggaacg	2820
ttgtgagggt	aaacaactgg	cggtatggat	gcggcgggac	cagagaaaaa	tactcaggg	2880
tcaatgccag	cgcttcgtta	atacagatgt	aggtgttcca	cagggtagcc	agcagcatcc	2940
tgcgatgcag	atccggaaca	taatggtgca	gggcgctgac	ttccgcgttt	ccagacttta	3000

ES 2 670 532 T3

cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtgcagacg ttttgacagca 3060  
 gcagtcgctt cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120  
 ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcagatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180  
 catgccggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcagaa 3240  
 ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300  
 gctccagcga aagcggctct cgccgaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360  
 gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgccggcagc atagtcatgc cccgcgccc 3420  
 ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacg gtcgagatc ccggtgccta 3480  
 atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 3600  
 tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgccctca 3660  
 ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720  
 aatcctggtt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttog gtatcgtcgt 3780  
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccga ctccgtaatg gcgcgattg 3840  
 cgcocagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagc gggaaacgat cctcattca 3900  
 gcatttgcatt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgta 3960  
 tcggctgaat ttgattgcca gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 4020  
 agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080  
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactggtg atgggtgtct 4140  
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccgga cattagtga gccagcttcc acagcaatgg 4200  
 catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcggttc gcgagaagat 4260  
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgctc taccatcgac accaccacgc 4320  
 tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgcgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380  
 gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgtgtg 4440  
 ccacgcgggt gggaatgtaa ttcagctcgg ccacgcgcg ttocactttt tcccggttt 4500  
 tcgcagaaac gtggtggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560  
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620  
 cttccggggc ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680  
 tctogacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740  
 ccggttgagca ccgcccccgc aaggaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtccc 4800  
 ccggccacgg ggcctgccac catacccacg ccgaaacaag cgtcatgag cccgaagtgg 4860  
 cgagcccgat cttcccacg ggtgatgtog gcgatatagg ccgacgcaac cgcacctgtg 4920

ES 2 670 532 T3

gcgccggtga	tgccggccac	gatgctccg	gcgtagagga	tcgagatctc	gatcccgcga	4980
aattaatag	actcactata	ggggaattgt	gagcggataa	caattccoct	ctagaaataa	5040
ttttgtttaa	ctttaagaag	gagatatacc	atgggctttg	atgatgatga	caagatcgtt	5100
gggggctaca	actgtgcggc	gcattctgtc	cctaccagg	tgtccctgaa	ttctggctac	5160
cacttctgtg	gtggctccct	catcaacgaa	cagtgggtgg	tatcagcagg	ccactgctac	5220
aagtcccgca	tccaggtgag	actgggagag	cacaacatca	aagtccctgga	ggggaatgag	5280
cagttcatca	atgcagccaa	gatcatccgc	cacccccaat	acgacaggaa	gactctgaac	5340
aatgacatca	tgtaaatcaa	gctctctca	cgtgcagtaa	tcaacgcaa	agtgtccacc	5400
atctctctgc	ccaccgcccc	tccagccact	ggcacgctgt	gcctcatctc	tggtggggc	5460
aacactgcga	gctctggcgc	caaaaacca	gacctgctgc	agtgcctgaa	cgctcctgtg	5520
ctgagccagg	ctaagtgtga	agcctcctac	cctggaaga	ttaccagcaa	catgttctgt	5580
gtgggcttcc	ttgagggagg	caaggattca	tgtcagggtg	attctgggtg	ccctgtggtc	5640
tgcaatggac	agctccaagg	agttgtctcc	tgggggtgatg	gctgtgcca	gaagaacaag	5700
cctggagtct	acaccaaggt	ctacaactat	gtgaaatgga	ttaagaacac	catagctgcc	5760
aatagctaac	tcgagcacca	ccaccaccac	cactgagatc	cggctgctaa	caaagcccga	5820
aaggaagctg	agttggctgc	tgccaccgct	gagcaataac	tagcataacc	ccttggggcc	5880
tctaaacggg	tcttgagggg	ttttttgctg	aaaggaggaa	ctatatccgg	at	5932

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene al menos una identidad en la secuencia del 90 % con el polipéptido de la SEQ ID NO 03, y que comprende las sustituciones:

- el residuo de aminoácido E64 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral con carga positiva,
- el residuo de aminoácido K123 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática y
- los residuos de aminoácido Y139 y D147 son sustituidos por un residuo de glutamina o de asparagina, y

en el que dicho polipéptido está caracterizado por que:

- un residuo de aminoácido seleccionado entre E16, E17 y/o E142 es sustituido por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática, y/o
- el residuo de aminoácido N18 es sustituido por un residuo de histidina, y/o
- el residuo de aminoácido R107 es sustituido por un residuo de lisina, y/o
- el residuo de aminoácido D138 es sustituido por un residuo de lisina o de arginina, y

en el que

- las posiciones de las sustituciones de aminoácido se refieren a la secuencia de aminoácidos del tripsinógeno 1 natural humano según la SEQ ID NO: 3;
- dicho polipéptido es escindible en un polipéptido que tiene una actividad enzimática similar a la natural cuando se compara con la tripsina 1 humana; y
- dicho polipéptido no muestra una autoactivación significativa.

2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que todos los E16, E17 y E142 son cada uno independientemente sustituidos por un residuo de aminoácido que comprende una cadena lateral alifática.

3. El polipéptido según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho polipéptido se caracteriza por una sustitución de aminoácido seleccionada entre la E16A, la E17A, la N18H, la E64K, la R107K, la K123L, la D138K, la Y139N, la E142L y la D147N.

4. El polipéptido de la reivindicación 1, que tiene una identidad en la secuencia de al menos el 90 % con la SEQ ID NO 01 y que contiene las sustituciones de aminoácido E16A, E17A, N18H, E64K, R107K, K123L, D138K, Y139N, E142L y D147N.

5. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. La secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 5, que consiste en, o que comprende, la SEQ ID NO 02 o la SEQ ID NO 18.

7. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Un método para la elaboración de un polipéptido según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende el uso de una célula hospedadora según la reivindicación 7.

9. Un método para la cuantificación de un analito, que comprende las etapas de:

- proporcionar un volumen de reacción,
- añadir a dicho volumen de reacción en una primera etapa, un analito y un primer ligando capaz de unirse específicamente al analito con una constante de disociación igual o inferior a  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l o  $10^{-9}$  mol/l,
- añadir a dicho volumen de reacción, en una segunda etapa, un segundo ligando capaz de unirse específicamente a dicho primer ligando con una constante de disociación igual o inferior a  $10^{-6}$  mol/l,  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l o  $10^{-9}$  mol/l, en el que el segundo ligando comprende un primer polipéptido,
- añadir a dicho volumen de reacción, en una tercera etapa, un polipéptido precursor, en el que dicho polipéptido precursor es escindible por dicho primer polipéptido en un segundo polipéptido y un sustrato peptídico de dicho segundo polipéptido que comprende un primer compañero de FRET luminiscente y un segundo compañero de FRET, en el que dicho primer compañero de FRET y dicho segundo compañero de FRET son capaces de interactuar de tal forma que la señal luminiscente de dicho primer compañero de FRET cambia con la aproximación espacial de dicho primer compañero de FRET y dicho segundo compañero de FRET, y en el que dicho sustrato es escindible por dicho segundo polipéptido entre dicho primer compañero de FRET y dicho

segundo compañero de FRET,

- la cuantificación de la cantidad de dicho analito mediante la medición de la luminiscencia de dicho primer compañero de FRET y/o de dicho segundo compañero de FRET,

5 **caracterizado por que**

dicho polipéptido precursor es un polipéptido según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10 10. El método según la reivindicación 9, en el que dicho sustrato es o comprende un péptido caracterizado por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO 06, la SEQ ID NO 07, la SEQ ID NO 08, la SEQ ID NO 09, la SEQ ID NO 10, la SEQ ID NO 11, la SEQ ID NO 12, la SEQ ID NO 13, la SEQ ID NO 14, la SEQ ID NO 15, la SEQ ID NO 16 y la SEQ ID NO 17.

15 11. El método según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que dicho primer polipéptido que tiene una actividad proteolítica es o comprende la cadena ligera catalítica de la enteropeptidasa humana o un polipéptido caracterizado por la SEQ ID NO 05.

20 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que dicho primer compañero de FRET se selecciona entre fluoresceína y [EuL]H.

25 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicho segundo compañero de FRET se selecciona entre Atto612Q, Cy5, TAMRA, BHQ-0, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, BHQ-10, Dabysilo, QXL 490, QXL 570, QXL 610, QXL 670, QXL 680, Iowa black FQ, Iowa black RQ, IRDye QC-1 y Eclipse Dark Quencher.

Fig. 1

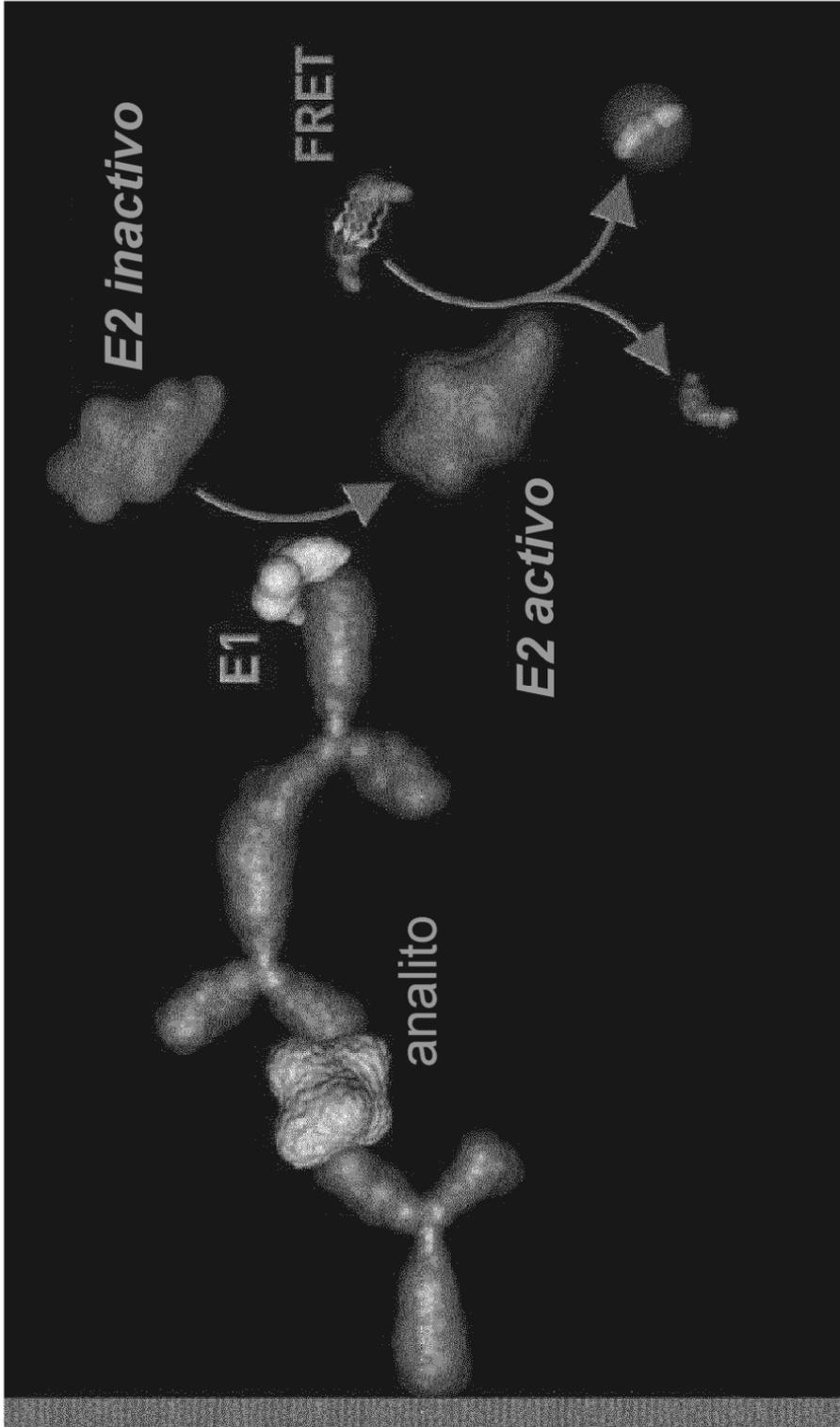


Fig. 2

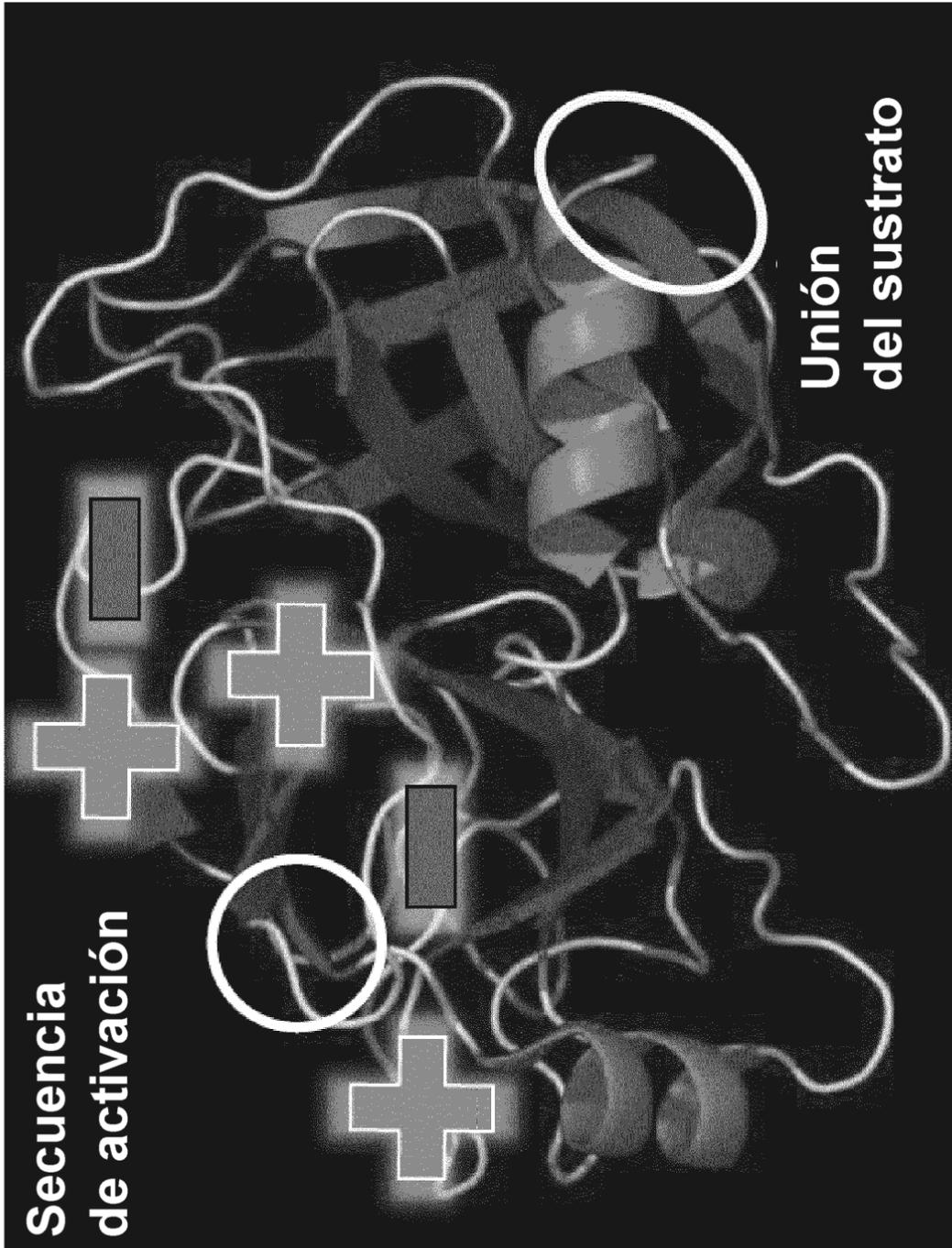




Fig. 4

PRSS1-sc	1	ATGGGCTTTGATGATGATGACAAGATCGTTGGGGGCTACAACCTGTGCGGC	50
PRSS1-WT	1	ATGGGCTTTGATGATGATGACAAGATCGTTGGGGGCTACAACCTGTGAGGA	50
PRSS1-sc	51	GCATTCTGTCCCTACCAGGTGTCCCTGAATTCTGGCTACCACTTCTGTG	100
		.	
PRSS1-WT	51	GAATTCTGTCCCTACCAGGTGTCCCTGAATTCTGGCTACCACTTCTGTG	100
PRSS1-sc	101	GTGGCTCCCTCATCAACGAACAGTGGGTGGTATCAGCAGGCCACTGCTAC	150
PRSS1-WT	101	GTGGCTCCCTCATCAACGAACAGTGGGTGGTATCAGCAGGCCACTGCTAC	150
PRSS1-sc	151	AAGTCCCGCATCCAGGTGAGACTGGGAGAGCACAACATCAAAGTCTTGGA	200
PRSS1-WT	151	AAGTCCCGCATCCAGGTGAGACTGGGAGAGCACAACATCGAAGTCTTGGA	200
PRSS1-sc	201	GGGAATGAGCAGTTCATCAATGCAGCCAAGATCATCGCCACCCCAAT	250
PRSS1-WT	201	GGGAATGAGCAGTTCATCAATGCAGCCAAGATCATCGCCACCCCAAT	250
PRSS1-sc	251	ACGACAGGAAGACTCTGAACAATGACATCATGTTAATCAAGCTCTCCTCA	300
PRSS1-WT	251	ACGACAGGAAGACTCTGAACAATGACATCATGTTAATCAAGCTCTCCTCA	300
PRSS1-sc	301	CGTGCAGTAATCAACGCCAAAGTGTCCACCATCTCTCTGCCACCGCCCC	350
PRSS1-WT	301	CGTGCAGTAATCAACGCCCGCGTGTCCACCATCTCTCTGCCACCGCCCC	350
PRSS1-sc	351	TCCAGCCACTGGCAGCGTGTGCCTCATCTCTGGCTGGGGCAACACTGCGA	400
PRSS1-WT	351	TCCAGCCACTGGCAGCAAGTGCCTCATCTCTGGCTGGGGCAACACTGCGA	400
PRSS1-sc	401	GCCTGGCGCCAAAACCCAGACCTGCTGCAGTGCCTGAACGCCTCTGTG	450
PRSS1-WT	401	GCTCTGGCGCCGACTACCCAGACGAGCTGCAGTGCCTGGACGCTCTGTG	450
PRSS1-sc	451	CTGAGCCAGGCTAAGTGTGAAGCCTCCTACCCTGGAAAGATTACCAGCAA	500
PRSS1-WT	451	CTGAGCCAGGCTAAGTGTGAAGCCTCCTACCCTGGAAAGATTACCAGCAA	500
PRSS1-sc	501	CAIGTTCGTGTGGGCTTCCTTGAGGGAGGCAAGGATTCATGICAGGGTG	550
PRSS1-WT	501	CAIGTTCGTGTGGGCTTCCTTGAGGGAGGCAAGGATTCATGICAGGGTG	550
PRSS1-sc	551	ATTCTGGTGGCCCTGTGGTCTGCAATGGACAGCTCCAAGGAGTTGTCTCC	600
PRSS1-WT	551	ATTCTGGTGGCCCTGTGGTCTGCAATGGACAGCTCCAAGGAGTTGTCTCC	600
PRSS1-sc	601	TGGGGTGATGGCTGTGCCAGAAGAACAAGCCTGGAGTCTACACCAAGGT	650
PRSS1-WT	601	TGGGGTGATGGCTGTGCCAGAAGAACAAGCCTGGAGTCTACACCAAGGT	650
PRSS1-sc	651	CTACAACCTATGTGAAATGGATTAGAACACCATAGCTGCCAATAGCTAA	699
PRSS1-WT	651	CTACAACCTATGTGAAATGGATTAGAACACCATAGCTGCCAATAGCTAA	699

Fig. 5

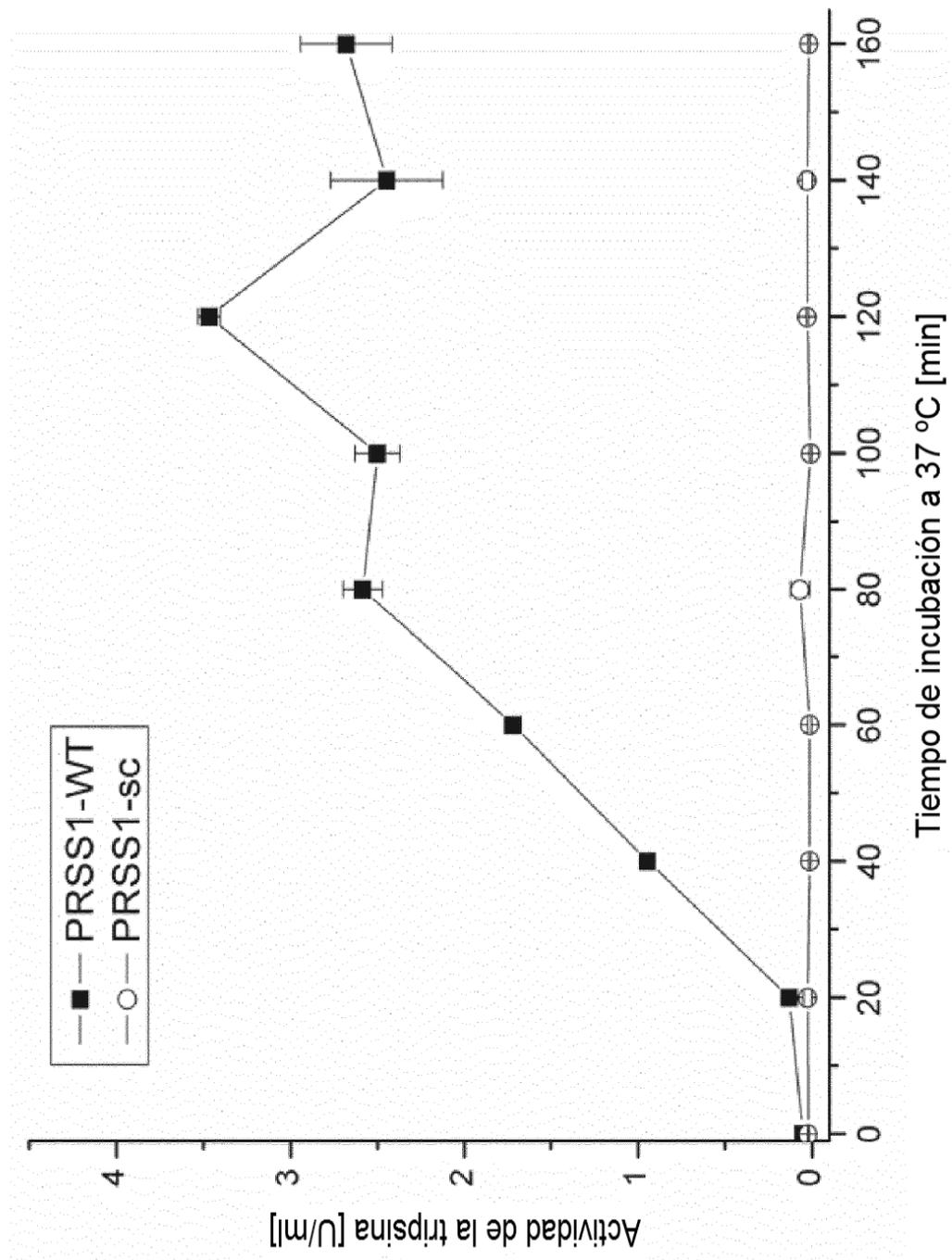


Fig. 6

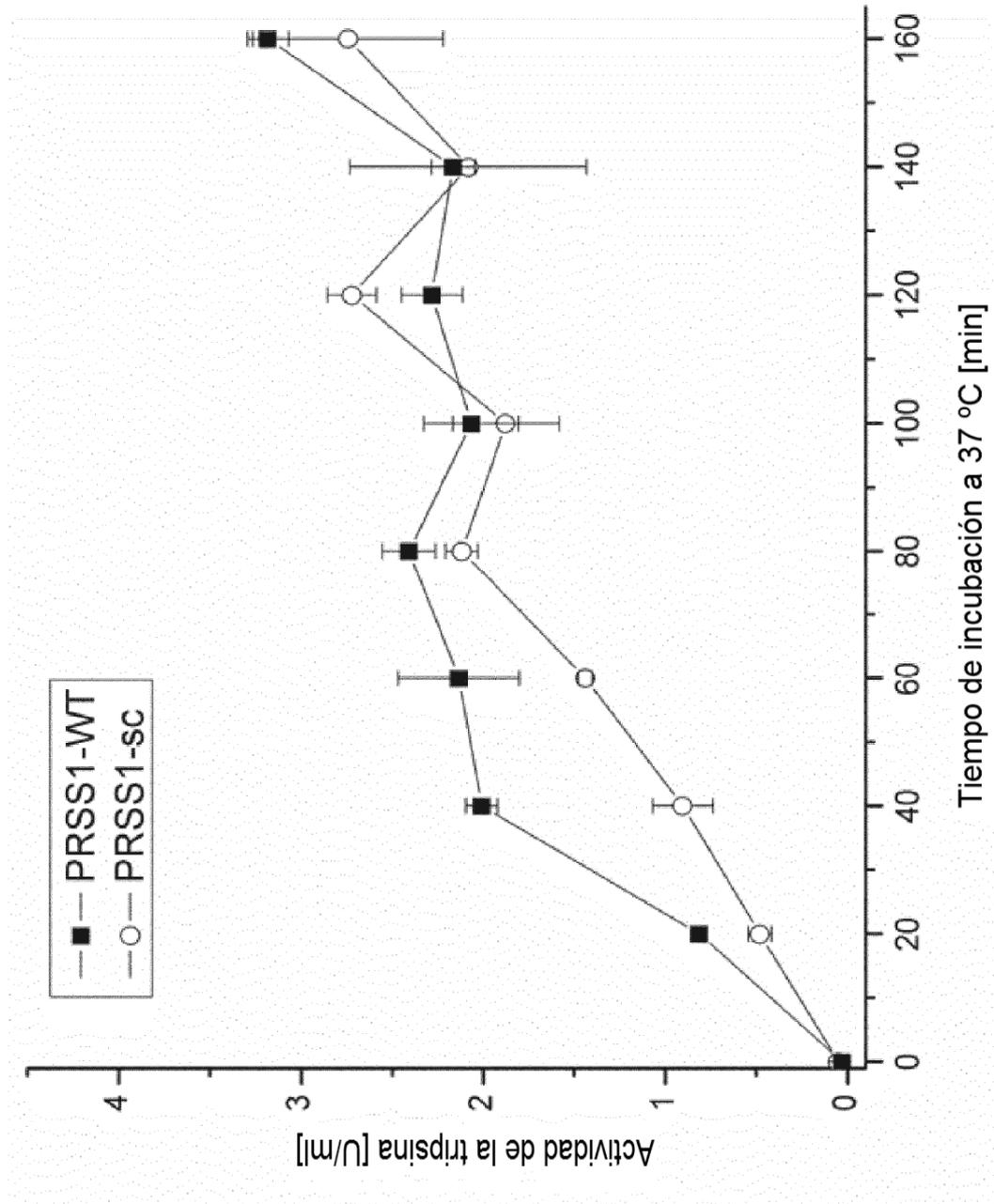


Fig. 7

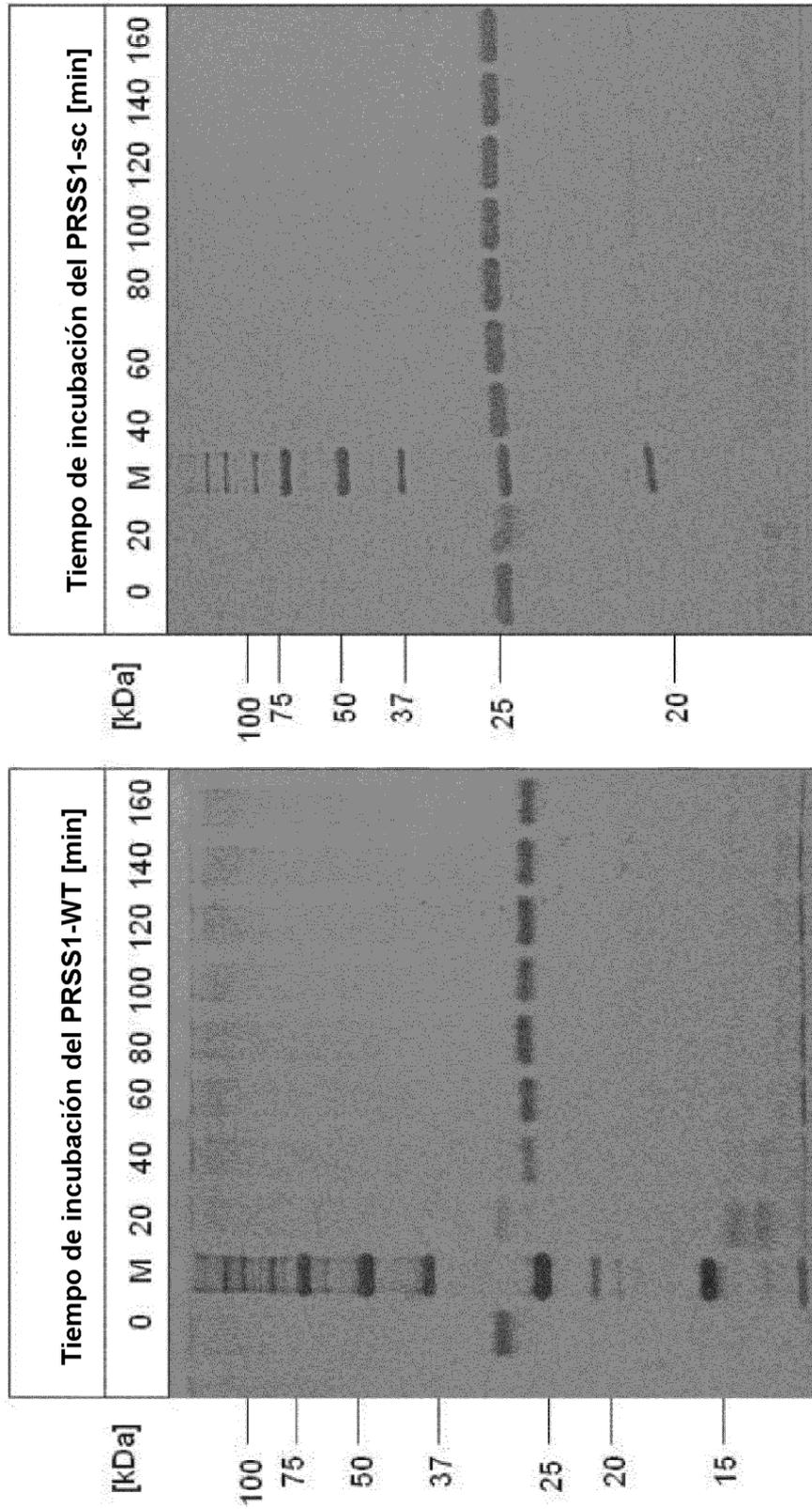


Fig. 8

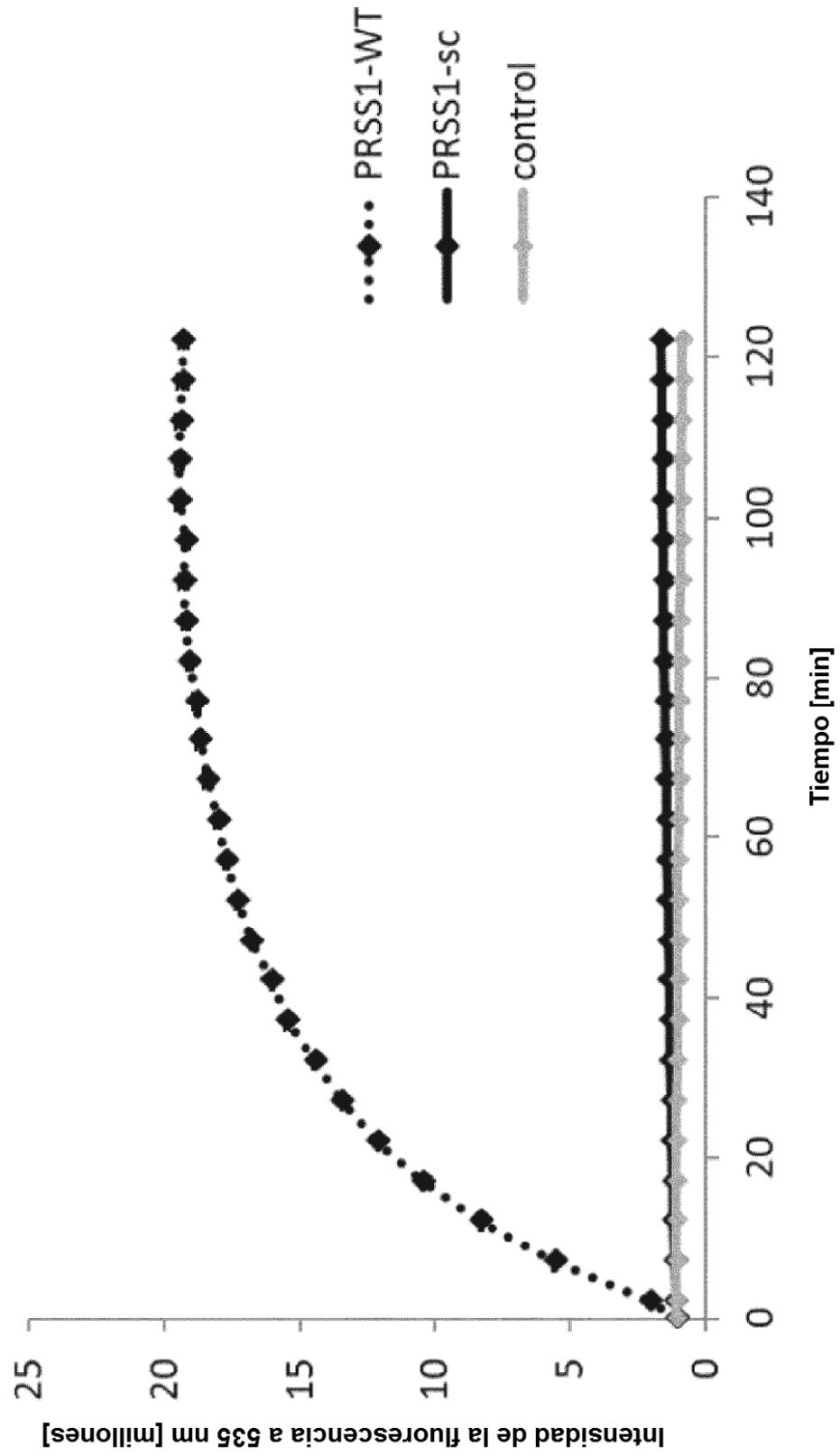


Fig. 9

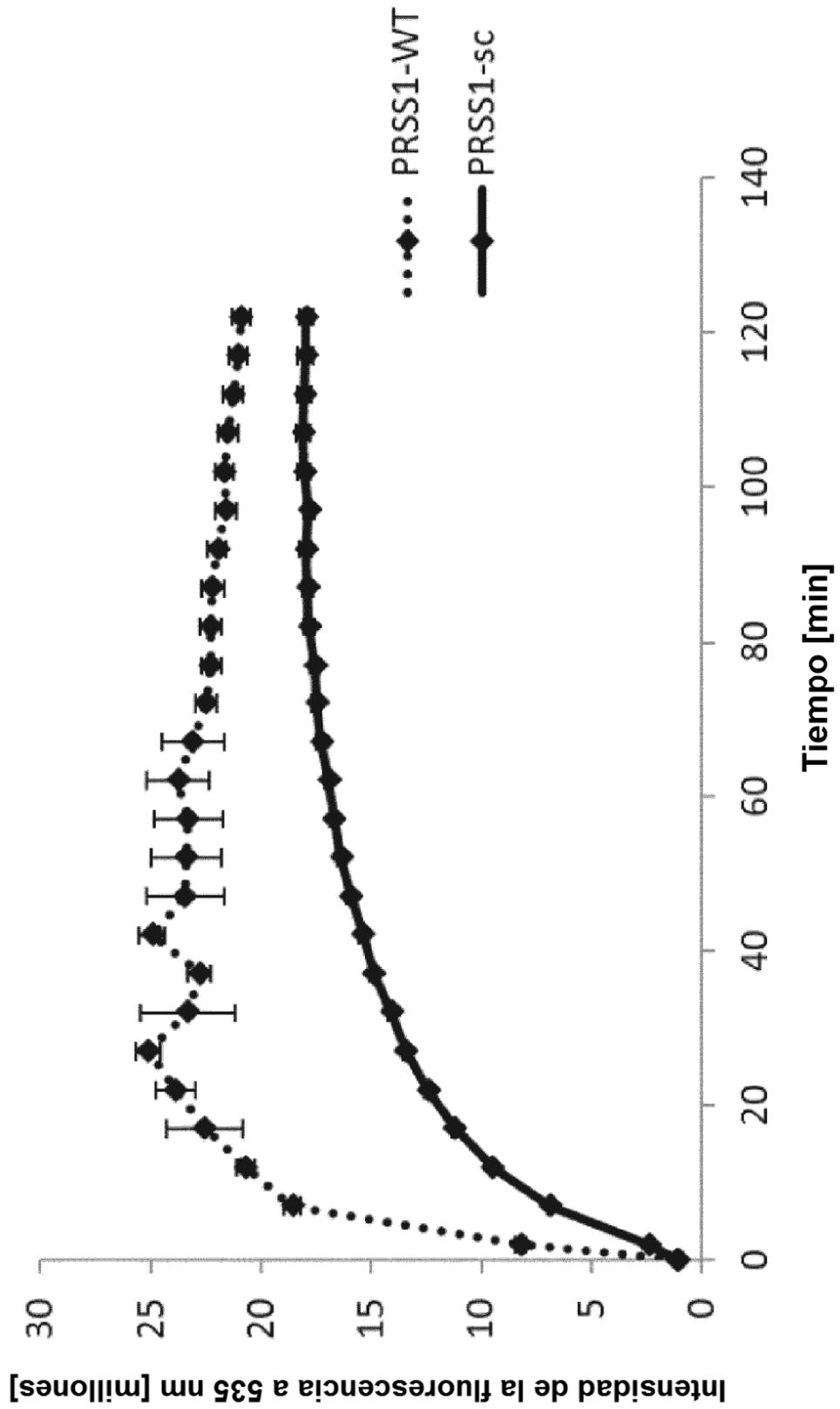


Fig. 10

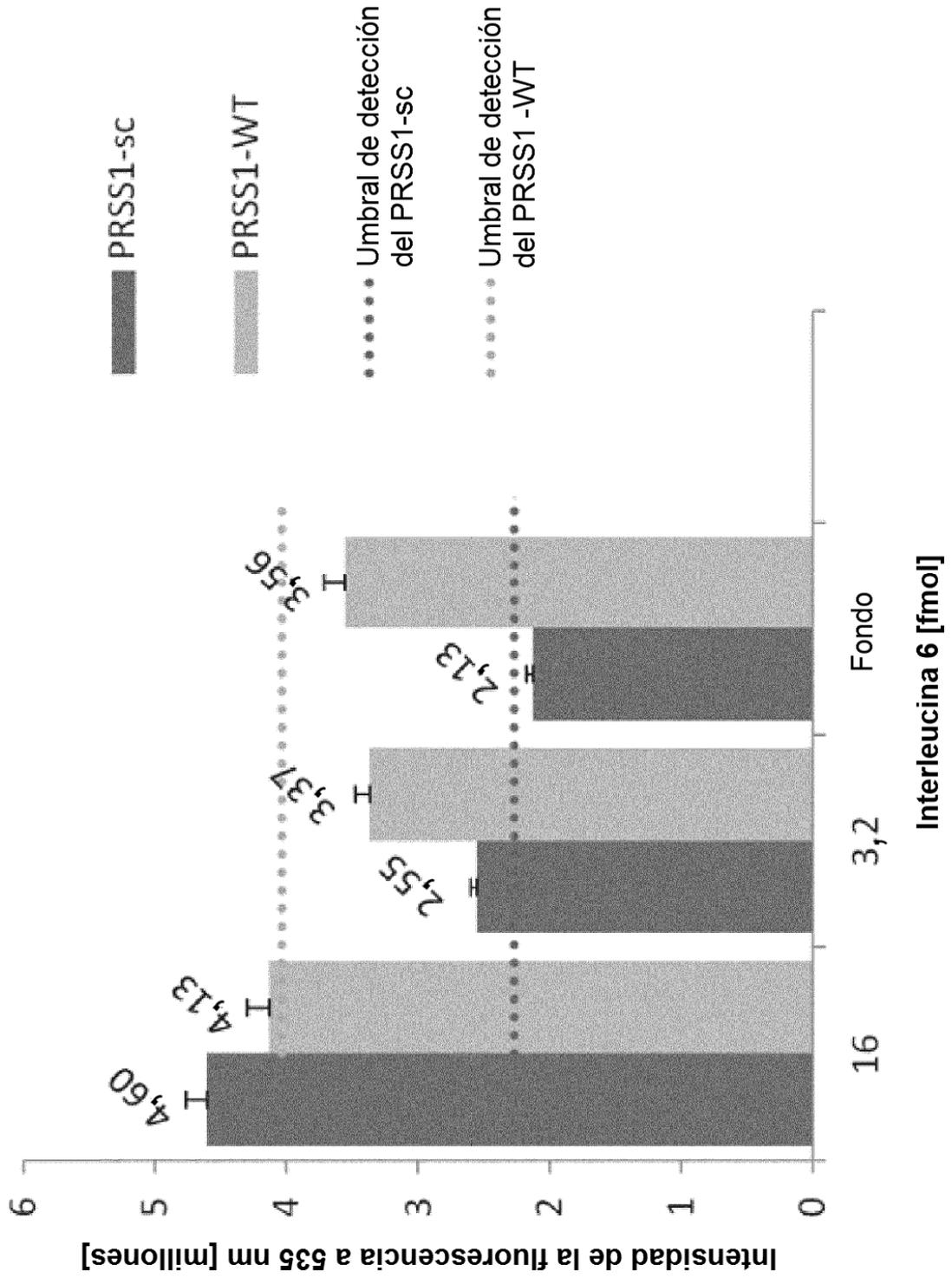


Fig. 11

