

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 288**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12816050 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2794875**

54 Título: **Cadena ligera de enteroquinasa modificada**

30 Prioridad:

23.12.2011 WO PCT/CN2011/002169

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

15.04.2021

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

WÖLDICKE, HELLE FABRICIUS;

ZHANG, XUJIA;

LIU, YUN y

TONG, WEIWEI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 819 288 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

Cadena ligera de enteroquinasa modificada

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con nuevos análogos de enteroquinasa de mamífero, métodos para prepararlos y el uso de dichos análogos de enteroquinasa de mamífero para escindir proteínas que tienen un sitio de escisión de enteroquinasa.

10

Antecedentes de la invención

15 La serina proteasa enteroquinasa (en abreviatura enteroquinasa o EK), también conocida como enteropeptidasa, es una glicoproteína heterodimérica, una enzima de mamífero que cataliza la conversión de tripsinógeno en tripsina activa. La enteroquinasa tiene preferencia por la secuencia de sustrato Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ((Asp)₄-Lys, DDDDK), donde escinde selectivamente después de la lisina. La enteroquinasa aislada de la mucosa duodenal bovina presenta un peso molecular (MW) de 150 000 y un contenido de carbohidratos del 35 por ciento. La enzima está compuesta por una cadena pesada (MW~115,000) y una cadena ligera unida por disulfuro (MW ~ 35 000) (Liepnieks y otros, J. Biol. Chem., 254(5): 1677-1683 (1979)). La función de la cadena pesada es anclar la enzima a la membrana mucosa. La cadena ligera actúa como subunidad catalítica.

20

Tan y otros, (Protein, expression and purification, academic press, San Diego, CA, vol. 56, núm. 1, 3 de octubre de 2007 (03-10-2007), páginas 40-47) describen la optimización de purificación y replegamiento de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina recombinante sobreexpresada en Escherichia coli.

25

Gasparian M y otros, (Protein expression and purification, academic press, San Diego, CA, vol. 31, núm. 1, 1 de septiembre de 2003 (01-09-2003), páginas 133-139) describe la expresión, purificación y caracterización de la subunidad catalítica de enteropeptidasa humana en Escherichia coli.

30

EL documento CN1470634 describe una variante de la cadena ligera de enteropeptidasa con alta actividad y alta estabilidad.

35 En E. coli, muchas proteínas de mamíferos se expresan como proteínas de fusión, que deben escindirse para liberar la proteína activa madura. Para ello se necesita una enzima de procesamiento, preferentemente una que escinda directamente en la unión sin dejar aminoácidos adicionales en el producto. La enteroquinasa es una enzima de este tipo, y se ha realizado un gran esfuerzo para establecer un proceso recombinante para obtener enteroquinasa o análogos de enteroquinasa en E. coli. Sin embargo, los resultados hasta ahora han sido bastante pobres: Los productos comerciales disponibles son caros y de baja actividad específica, debido a la renaturalización ineficaz de la EK precipitada o la secreción ineficaz de la EK soluble.

40

Un proceso en E. coli que apunta a un producto de EK soluble conduce a una mezcla de proteína soluble e insoluble, lo que requiere 2 vías de purificación, columnas de afinidad caras y rendimientos bajos en total. Para obtener un producto uniforme, la EK debe producirse como material insoluble en cuerpos de inclusión. Estos son fáciles de aislar, pero difíciles de renaturalizar con rendimientos satisfactorios, debido a la posible agregación de la proteína.

45

Un objeto de la invención es obtener un análogo de enteroquinasa de mamífero con propiedades mejoradas.

Breve descripción de la invención

50 La presente invención se relaciona con análogos de enteroquinasa de mamíferos mutados en sitios apropiados. Una o más sustituciones de un análogo de enteroquinasa de la invención pueden ser, por ejemplo, de aminoácidos cargados hidrofóbicos a hidrofílicos con respecto a los aminoácidos en la enteroquinasa de mamífero parental (tipo salvaje).

55 En un aspecto de la invención, se obtiene un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en donde dicho análogo comprende las sustituciones C112A, L134K e I135K, dicho análogo comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1, y dicho análogo tiene actividad de enteroquinasa proteasa.

60 La invención también se relaciona con un método para obtener una solubilidad mejorada en un proceso de renaturalización de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa que comprende la etapa de mutar los aminoácidos hidrofóbicos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje a aminoácidos hidrofílicos y, opcionalmente, mutar otros aminoácidos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje, en donde los aminoácidos hidrofóbicos sometidos a la mutación están presentes en la superficie de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje plegada, dicho análogo comprende las sustituciones C112A, L134K e I135K,

65

dicho análogo comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1, y dicho análogo tiene actividad de enteroquinasa proteasa.

5 En un aspecto, la invención proporciona un proceso de producción mejorado para la obtención de análogos de enteroquinasa de mamíferos. También o alternativamente, en un segundo aspecto, la invención proporciona un proceso de producción mejorado que resulta en un rendimiento de producción mejorado.

En un aspecto de la invención, el método para la producción de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende las etapas:

10 a) cultivar las células huéspedes en un medio de crecimiento que comprende un inductor, en donde las células huéspedes comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa;

15 b) recuperar las células con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa en cuerpos de inclusión

c) solubilizar y replegar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa; y

20 d) purificar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa.

En un aspecto, la invención proporciona un método para producir de manera recombinante un péptido o proteína en una célula huésped bacteriana o de levadura. En un aspecto, el método comprende:

25 a) expresar en levadura o bacteria una proteína de fusión que comprende el péptido o proteína a producir;

b) escindir la proteína de fusión con un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1-9; y

30 c) aislar el péptido o proteína producidos.

La invención puede resolver, además, otros problemas que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.

Breve descripción de los dibujos

35 **Figura 1:** Dependencia de la expresión de Trx-EK_L (A) y Trx-EK_{LM} (B) con el tiempo de inducción. **M:** Marcador; **BI:** Antes de la inducción; **I2, I3, I4 e I6** representan el tiempo de inducción (h) por IPTG, respectivamente; gel al 15 %; se usó Medio definido de fermentación (FDM).

40 **Figura 2:** Diagrama de flujo para la purificación de EK

45 **Figura 3:** Figura 3: % de rendimiento de replegamiento (figura 3A) y cantidad de EK_L purificada y EK_{LM} en tampón de replegamiento de 1l (mg, figura 3B) en función de la concentración de Trx-enlazador-EK_L y Trx-enlazador-EK_{LM} durante el replegamiento. ▲/△: Trx- enlazador-EK_L, cuerpo de inclusión (IB) 1 mg/ml; ●/○: Trx- enlazador-EK_{LM}, IB 6 mg/ml; ◆/◇: Trx- enlazador-EK_{LM}, IB 4 mg/ml. 1,3 g de sedimento celular de Trx-enlazador-EK_{LM} o Trx-enlazador-EK_L se lisaron y los cuerpos de inclusión se solubilizaron a diferentes concentraciones, es decir, 1 mg/ml para Trx-enlazador-EK_L, 4 mg/ml o 6 mg/ml para Trx-enlazador-EK_{LM} en tampón que contiene Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM. Después de la dilución a las concentraciones indicadas en el tampón de replegamiento que contiene Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3 e incubación a 20 °C durante 24 horas, la EK_{LM}/ EK_L se sometió a purificación mediante cromatografía Q HP como se describe en Experimentos.

50 **Figura 4:** El rendimiento de replegamiento de Trx-EK_L aumenta con el tiempo de incubación. 1,3 g de sedimento celular de Trx-EK_L se lisaron y los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 1,6 mg/ml en tampón que contiene Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM. Después de una dilución de 100 veces en el tampón de replegamiento que contiene Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3 y la incubación a 20°C durante 24 horas o 48 horas, respectivamente, se evaluó la actividad enzimática como se describe en Experimentos.

55 **Figura 5:** Dependencia del rendimiento de replegamiento con la concentración de urea. 1,3 g de sedimento celular de Trx-EK_L se lisaron y los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 1,6 mg/ml en tampón que contiene Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM. Después de una dilución de 100 veces en el tampón de replegamiento que contiene Tris 20 mM, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3 y urea 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM o 2 mM, respectivamente, y la incubación a 20°C durante 24 horas, se evaluó la actividad enzimática como se describe en Experimentos.

60 **Figura 6:** Dependencia del rendimiento de replegamiento con la relación redox GSSG/GSH. 1,3 g de sedimento celular de Trx-EK_L se lisaron y los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 1,6 mg/ml en tampón que contiene Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM. Después de una dilución de 100 veces en el tampón de replegamiento que contiene Tris 20

mM, urea 1 M, pH 8,3 y GSSG/GSH como se indica, y la incubación a 20°C durante 24 horas, se evaluó la actividad enzimática como se describe en Experimentos.

Figura 7: Purificación de EK_{LM} por cromatografía Q HP. **(A):** Un cromatograma. EK_{LM} se eluyó mediante gradiente de sodio, como se muestra en P2. Se indicaron las fracciones que contienen actividad enzimática de EK. **(B):** SDS-PAGE de EK_{LM} en cada etapa en condiciones reducidas. **EK_{LM}:** EK_{LM} de alta pureza (>90 %) obtenida a partir de la purificación adicional de P2 mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica; **M:** Marcador, **BI:** Antes de la inducción, **Total:** Lisados totales; **Sob.:** Sobrenadante después de la lisis de las células; **IB:** Cuerpos de inclusión sometidos a replegamiento y purificación; **App:** Muestras aplicadas a la columna Q HP después del replegamiento y la autoactivación; **P1, P2 y P3** representan las fracciones agrupadas de cada pico indicado en la Figura 7A. **(C):** Actividad enzimática. Δ : P1. 1 ul de muestra añadido a 100 ul de tampón de reacción; \bullet : P2. Después de una dilución de 5 veces de P2, se añadió 1 ul de muestra diluida a 100 ul de tampón de reacción; \circ : P3. 1 ul de muestra añadido a 100 ul de tampón de reacción; \blacksquare : Blanco. Se añadió 1 ul de tampón (Tris 20 mM, pH 8,0) a 100 ul de tampón de reacción. 1,3 g de sedimento celular de Trx-EK_{LM} se lisaron y los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 4 mg/ml en tampón que contiene Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM. Después de una dilución de 80 veces en tampón de replegamiento que contiene Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3 y la incubación a 20°C durante 24 horas, la EK_{LM} se sometió a purificación mediante cromatografía Q HP como se describe en Experimentos.

Figura 8: Actividad enzimática específica similar entre EK_L y EK_{LM}. 25EU de EK_L y EK_{LM} purificadas se aplicó en SDS-PAGE.

Figura 9: EK_{LM} es estable durante al menos 3 meses a -80 °C o 4 °C. La EK_{LM} purificada como se describe en Experimentos se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C o 4 °C. Después de 3 meses, 5 µg de EK_{LM} de cada temperatura se aplicó en SDS-PAGE en condiciones reducidas y no reducidas, y se comparó con EK_{LM} recién purificada (Fresca).

Figura 10: Comparación de las secuencias de aminoácidos de trxEK_{LM} (SEQ ID No: 9) y trx-enlazador-EK_{LM} (SEQ ID No: 8). En trx-enlazador-EK_{LM} el espaciador entre trx y EK_{LM} es 37 aminoácidos más largo que en trxEK_{LM}.

Figura 11: La eficiencia de replegamiento de Trx-enlazador-EK_{LM} aumenta con PEG1000 o ciclodextrina añadida en el tampón de replegamiento. El cuerpo de inclusión se solubilizó en 7,3 mg/ml y se diluyó en una relación de 1 a 20 en el tampón de replegamiento. La concentración final de PEG1000 y ciclodextrina en el tampón de replegamiento es 1 % y 1,5 % respectivamente.

Descripción

La presente invención se relaciona con análogos de enteroquinasa de mamíferos mutados en sitios apropiados. Una o más sustituciones de un análogo de enteroquinasa de la invención pueden ser, por ejemplo, de aminoácidos cargados hidrofóbicos a hidrofílicos con respecto a los aminoácidos en la enteroquinasa de mamífero parental (tipo salvaje). En un aspecto, una o más sustituciones de un análogo de la enteroquinasa de mamífero de la invención es de aminoácidos cargados hidrofóbicos a hidrofílicos con respecto a los aminoácidos de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje. En un aspecto, los aminoácidos hidrofóbicos sometidos a mutación están presentes en la superficie de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero de tipo salvaje plegada tal como la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje plegada.

La cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje generalmente presenta una buena actividad en presencia de varios detergentes y desnaturizantes en un amplio intervalo de pH (4,5-9,5) e intervalo de temperatura (4-45 °C). Por tanto, la cadena ligera de la enteroquinasa como herramienta poderosa se ha usado en biotecnología para la escisión in vitro de proteínas de fusión.

Sin embargo, los complicados procesos de producción y el bajo rendimiento de producción extraída de animales, tal como porcinos y bovinos, ha establecido una limitación para la aplicación de EK en biotecnología. Recientemente, se ha obtenido en E. coli la cadena ligera de la enteroquinasa recombinante mediante secreción de la cadena ligera de la enteroquinasa activa o mediante acumulación intracelular de cuerpos de inclusión de la cadena ligera de la enteroquinasa inactiva, el replegamiento y la activación. Además, se ha demostrado que la sustitución de Cys112 por Ala de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina potenció la actividad enzimática, presumiblemente debido a un replegamiento facilitado. Cys112 une la cadena ligera a la cadena pesada en la holoenzima y no es una parte esencial de la cadena ligera.

En un aspecto de la invención, el análogo de la enteroquinasa de mamífero es un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. En un aspecto de la invención, el análogo de la enteroquinasa de mamífero es un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. En un aspecto, el análogo de la cadena ligera bovina comprende la(s) sustitución(ones) en la posición 134 y/o en la posición 135. En un aspecto el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende sustituciones en las posiciones 112, 134 y/o 135. En un aspecto, el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende al menos dos sustituciones. En un aspecto, el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende al

menos tres sustituciones. En un aspecto el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende sustituciones en las posiciones 112, 134 y 135. En un aspecto, el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina comprende las sustituciones C112A, L134K e I135K.

5 Los análogos novedosos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina incluyen aquellos que tienen la conformación estructural primaria (es decir, la secuencia de aminoácidos) de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje. La cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje tiene la secuencia sustancialmente como se establece en la SEQ ID NO: 1.

10 1 IVGGSDSREG AWPWVVALYF DDQQVCGASL VSRDWLVSAA HCVYGRNMEP

5 1SKWKAVLGLH MASNLTPQI ETRLIDQIVI NPHYNKRRKN NDIAMMHLEM

101 KVNYYTDYIQP ICLPEENQVF PPGRICSIAG WGALIYQGST ADVLQEADV

15 151 LLSNEKCQQQ MPEYNITENM VCAGYEAGGV DSCQGDSSGGP LMCQENNRWL

201 LAGVTSFGYQ CALPNRPGVY ARVPRFTEWI QSFLH

20 **SEQ ID NO: 1**

De acuerdo con un aspecto, los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención tienen actividad de enteroquinasa proteasa. También se encuentran disponibles anticuerpos para tales proteasas.

25 El análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina descrito por la presente invención mantiene la actividad de proteasa de la enteroquinasa de tipo salvaje para su uso como una proteasa de restricción para escindir específicamente proteínas de fusión.

30 El término "enteroquinasa bovina" como se usa en la presente descripción significa la enzima enteroquinasa bovina cuya estructura y propiedades son bien conocidas. Las enteroquinasas de mamíferos son heterodímeros que contienen carbohidratos con una cadena pesada de 650-800 aminoácidos y una cadena ligera catalítica de alrededor de 235 aminoácidos y una homología global de 75-80 % (Liepniecks y otros, J. Biol. Chem. 254, 1677 (1979), Matsushima y otros, J. Biol. Chem. 269 (31), 19976 (1994), Kitamoto y otros, Biochemistry 34, 4562 (1995) para la enteroquinasa bovina, porcina y humana, respectivamente). Se informan estudios adicionales de las cadenas ligeras catalíticas en LaVallie y otros, J. Biol. Chem. 268 (31), 23311-17 (1993) sobre la EK bovina y en Matsushima y otros, J. Biochem. 125, 947, (1999) sobre la EK porcina.

40 El término "cadena ligera de la enteroquinasa bovina" como se usa en la presente descripción significa la cadena ligera de la enteroquinasa bovina que tiene 4 puentes disulfuro. La cadena ligera de la enteroquinasa bovina se describe, por ejemplo, en LaVallie y otros, arriba.

45 Cuando se usa en la presente descripción, el término "superficie" en relación con los aminoácidos presentes en la superficie de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje plegada significa los aminoácidos identificados como presentes en la superficie de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje plegada en una estructura 3D como, por ejemplo, se describe en Mod Base P 98072.

50 "Una cadena ligera de la enteroquinasa" de acuerdo con la invención debe entenderse en la presente descripción como la cadena ligera de la enteroquinasa bovina o una cadena ligera de la enteroquinasa de otra especie tal como la cadena ligera de la enteroquinasa porcina o humana.

El término "péptido de la cadena ligera de la enteroquinasa" como se usa en la presente descripción significa un péptido que es la cadena ligera de la enteroquinasa bovina o un análogo o derivado de la misma con actividad de enteroquinasa.

55 Como se usa en la presente descripción, la actividad de enteroquinasa significa la capacidad de escindir sustratos peptídicos o proteicos en un sitio específico; para sustratos proteicos, este generalmente sigue la secuencia (Asp)₄-Lys, o una secuencia similar tal como las descritas en Light y otros, Anal. Biochem. 106: 199(1980); (un grupo de aminoácidos cargados negativamente seguido por un aminoácido cargado positivamente). Típicamente, tal actividad se mide mediante la activación del tripsinógeno al escindir el propéptido N-terminal (que contiene (Asp)₄-Lys) con la enteroquinasa o el análogo de la enteroquinasa y subsecuentemente al evaluar la cantidad de tripsina activa generada mediante el uso del tosil-arginina-metiléster (TAME). Alternativamente, la actividad de la enteroquinasa se puede medir directamente al incubar la enzima con el sustrato peptídico Gly (Asp)₄-Lys-ss-naftilamida y medir el aumento de fluorescencia (excitación a 337 nm, emisión a 420 nm) generada por la escisión y liberación del resto ss-NA (ss-naftilamida). Véase, por ejemplo, Grant y otros, Biochem. Biophys. Acta. 567:207(1979). La enteroquinasa bovina también es activa en algunos sustratos de tripsina como TAME y BAEE (bencil-arginina-etil-éster).

El término "cadena ligera de la enteroquinasa de tipo salvaje" como se usa en la presente descripción pretende significar una cadena ligera de la enteroquinasa antes de que se le haya aplicado cualquier sustitución de acuerdo con la invención.

5 El término "análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa" o "análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina" como se usa en la presente descripción significa una cadena ligera de la enteroquinasa bovina modificada en donde uno o más residuos de aminoácidos de la cadena ligera de la enteroquinasa han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos de la cadena ligera de la enteroquinasa se han eliminado y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han añadido y/o insertado en la cadena ligera de la enteroquinasa.

10 En una modalidad, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos (sustituciones, deleciones, adiciones (que incluyen inserciones) y cualquier combinación de las mismas) con respecto a la cadena ligera de la enteroquinasa bovina, alternativamente menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 modificaciones con respecto a la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa comprende 5 modificaciones de aminoácidos, en un aspecto 4 modificaciones de aminoácidos, en un aspecto 3 modificaciones de aminoácidos, en un aspecto 2 modificaciones de aminoácidos y en un aspecto 1 modificación de aminoácido con respecto a la cadena ligera de la enteroquinasa bovina.

15 Las modificaciones en la cadena ligera de la molécula de enteroquinasa se indican a través de la posición y el código de una o tres letras para el residuo de aminoácido que sustituye el residuo de aminoácido nativo. Mediante el uso de los códigos de una letra para los aminoácidos, los términos como 134K y 135K designan que el aminoácido en la posición 134 y 135, respectivamente, es K. Mediante el uso de los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son 134Lys y 135Lys, respectivamente. Así, por ejemplo, cadena ligera de la enteroquinasa bovina 112Ala, 134Lys, 135Lys es un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina donde el aminoácido en la posición 112 se sustituye por alanina, el aminoácido en la posición 134 se sustituye por lisina y el aminoácido en la posición 135. se sustituye por lisina.

20 En la presente descripción, el término "residuo de aminoácido" es un aminoácido del cual, formalmente, un grupo hidroxilo se ha eliminado de un grupo carboxi y/o del cual, formalmente, un átomo de hidrógeno se ha eliminado de un grupo amino.

25 Los ejemplos de análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina son aquellos en donde la Leu en la posición 134 está sustituida con Lys u otro aminoácido cargado, en la posición 135 donde la Ile está sustituida con Lys u otro aminoácido cargado. Además, la Cys en la posición 112 puede estar sustituida con varios aminoácidos que incluyen Ala y Ser.

30 Otros ejemplos de análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina incluyen, sin limitación: cadena ligera de la enteroquinasa bovina 134Lys; cadena ligera de la enteroquinasa bovina 135Lys; cadena ligera de la enteroquinasa bovina 134Lys,135Lys; cadena ligera de la enteroquinasa bovina 112Ala,134Lys,135Lys; 112Ala,134Lys cadena ligera de la enteroquinasa bovina; 112Ala,135Lys cadena ligera de la enteroquinasa bovina y cualquier combinación de este tipo, que incluye las sustituciones con otros aminoácidos cargados.

35 En un aspecto, se obtiene un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina que tiene una solubilidad mejorada en un proceso de renaturalización con respecto a la cadena ligera de la enteroquinasa bovina natural. En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención tiene uno o más aminoácidos hidrofóbicos orientados a la superficie que han sido mutados a aminoácidos cargados hidrofílicos en donde se obtiene una solubilidad mejorada en un proceso de renaturalización con respecto a la cadena ligera de la enteroquinasa bovina natural. En un aspecto, los aminoácidos hidrofóbicos orientados a la superficie para la sustitución por aminoácidos cargados hidrofílicos se seleccionan después de alinear la cadena ligera de la enteroquinasa bovina con otras serina proteasas y escanear las superficies accesibles al solvente a través de un modelo computacional 3D de enteroquinasa.

40 El método para replegar un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención es conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el replegamiento puede realizarse mediante desnaturalización en urea, seguido por replegamiento oxidativo en glutatión u otro entorno redox.

45 En un aspecto, se usa un tampón (tampón de replegamiento) durante el proceso de replegamiento. En un aspecto de la invención, el tampón de replegamiento comprende urea. En un aspecto, el tampón de replegamiento comprende urea entre 0 M y 2 M. En un aspecto, el tampón de replegamiento comprende urea entre 0,5 M y 2 M, urea entre 0 M y 1,5 M o urea entre 0,5 M y 1,5 M. En un aspecto, el tampón de replegamiento comprende aproximadamente urea 1 M.

50 La concentración inicial de cuerpos de inclusión puede afectar el rendimiento del replegamiento. En un aspecto de la invención, la concentración de cuerpos de inclusión está entre 1 y 4 mg/ml.

En un aspecto de la invención, la etiqueta de tioredoxina (Trx) se elimina durante el replegamiento, es decir, durante la dilución y la incubación en condiciones de replegamiento. Por tanto, se ha descubierto que el replegamiento y la activación pueden obtenerse sin la adición de una enzima de activación. En un aspecto de la invención, el enlazador que conecta la etiqueta de trx y el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención se elimina mediante autoescisión. Por tanto, los inventores han descubierto sorprendentemente que el enlazador que conecta la etiqueta de trx y el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención facilita el replegamiento.

En un aspecto, se obtiene menos agregación durante el proceso de renaturalización de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención con respecto a la agregación obtenida durante el proceso de renaturalización de EK de tipo salvaje. En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención tiene las sustituciones L134K e I135K, donde el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina es más soluble durante el proceso de renaturalización con respecto a la EK de tipo salvaje. En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención tiene además la sustitución C112A. Los inventores creen que al mutar la cisteína sola en la posición 112, que en el heterodímero de EK de tipo salvaje está implicada en la unión disulfuro de la cadena ligera a la cadena pesada, la formación de los 4 puentes disulfuro en la cadena ligera de EK puede facilitarse.

En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención tiene una actividad de enteroquinasa completa en comparación con la enteroquinasa bovina de tipo salvaje. En un aspecto, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención tiene una actividad funcional o biológica sustancialmente equivalente a la de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje. Por ejemplo, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina tiene actividades funcionales o biológicas sustancialmente equivalentes (es decir, es un equivalente funcional) del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, tiene actividades de enteropeptidasa sustancialmente equivalentes).

Las formas de ácido nucleico que codifican análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa también se describen en la presente descripción. Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ADN sintético preparado mediante síntesis química, así como también ADN con deleciones o sustituciones, variantes alélicas y secuencias que se hibridan con ellos en condiciones estrictas siempre que codifiquen análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa.

En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos, y en donde dicho ácido nucleico codifica un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención. En una modalidad, el ácido nucleico está operativamente unido a un promotor inducible. En una modalidad, se proporciona un vector recombinante que comprende el ácido nucleico unido operativamente al promotor inducible. En una modalidad, el promotor inducible se selecciona de un grupo que consiste en AraB, T7, trp, lac, tac.

Una modalidad adicional de la invención proporciona una célula huésped que comprende el vector recombinante que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención.

Un aspecto adicional de la invención proporciona la célula huésped que comprende el vector recombinante que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que codifica un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención. En una modalidad, la célula huésped se selecciona de un grupo que consiste en *E. coli*, *B. subtilis*, *S. saccharomyces* y *A. oryzae*.

La producción de polipéptidos, por ejemplo, cadena ligera de la enteroquinasa, es bien conocida en la técnica. El análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis clásica de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida mediante el uso de química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, ver, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Hijos, 1999. El análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina también puede producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permitan la expresión del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. Se pueden usar varios métodos recombinantes en la producción de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina y análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. Los ejemplos de métodos que pueden usarse en la producción de enteroquinasa en microorganismos tales como, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* se describen, por ejemplo, en el documento núm. WO 94/16083.

Normalmente, el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina se produce al expresar una secuencia de ADN que codifica el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina en cuestión o un precursor del mismo en una célula huésped adecuada mediante una técnica bien conocida como se describe en, por ejemplo, el documento WO 94/16083

Los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención pueden recuperarse del medio de cultivo celular o de las células. Los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromato enfoque, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativa (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación por sulfato de amonio) o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

En un aspecto, los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la presente invención se purifican mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico. En un aspecto adicional, la cromatografía de intercambio aniónico va seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica. En un aspecto, los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la presente invención se purifican mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico Q HP. En un aspecto adicional, a la cromatografía de intercambio aniónico Q HP le sigue la cromatografía de interacción hidrofóbica con Fenil FF.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso mejorado para la producción de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina, en donde dicho método comprende las etapas:

a) cultivar las células huéspedes en un medio de crecimiento que comprende un inductor, en donde las células huéspedes comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa;

b) recuperar las células con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa en cuerpos de inclusión

c) solubilizar y replegar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa; y

d) purificar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa.

La invención proporciona un nuevo proceso recombinante para la producción de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de mamífero tal como un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina en *E. coli* de una manera muy eficiente y económica.

La expresión de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención puede, por ejemplo, localizarse en los cuerpos de inclusión de *E. coli* o en el material secretado de la levadura. En una modalidad, la expresión de la enteroquinasa se localiza en los cuerpos de inclusión de *E. coli*.

También son bien conocidas en la técnica diversas cepas de *E. coli* que son útiles como células huéspedes para la producción de actividad de enteroquinasa homogénea no glicosilada. Una lista no exclusiva de tales cepas incluye *E. coli* B BL21 DE3, *E. coli* K12 W3110, MC1061, DH1, K803, HB101, JM101 y otras cepas similares a K12. Alternativamente, se pueden usar otras especies bacterianas, incluyendo *B. subtilis*, diversas cepas de *Pseudomonas*, otros bacilos y similares.

Muchas cepas de células de levadura, conocidas por los expertos en la técnica, también están disponibles como células huéspedes para la expresión de la actividad de enteroquinasa de la presente invención. Las células de levadura son especialmente útiles como huéspedes para la fusión pre/pro con enteroquinasa madura. Cuando se expresa mediante el uso de un vector de levadura adecuado, la fusión se secreta en virtud de un péptido señal.

Cuando el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de esta invención se expresa en células bacterianas, puede expresarse intracelularmente usualmente como cuerpos de inclusión, o puede secretarse de las células bacterianas en forma activa si se incluye una señal secretora. Cuando sea necesario o deseado, como cuando se observa una bioactividad reducida, la actividad de enteroquinasa puede obtenerse mediante métodos convencionales como la solubilización de proteína en urea o HCl de guanidina, seguida de dilución para reducir la concentración de estos reactivos y el tratamiento con agentes oxidantes tal como ditioneitol o ss-mercapto etanol para mejorar el replegamiento.

En una modalidad, los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención son proteasas enzimáticamente activas que escinden específicamente después de una secuencia (Asp)₄-Lys (DDDDK) en varios números de productos proteicos fusionados entre la etiqueta de afinidad y la proteína madura. En una modalidad, los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención han retenido la actividad enzimática

En un aspecto de la invención, se obtiene un proceso para preparar un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina en células de *E. coli*, en donde las células de *E. coli* se transforman con un plásmido que porta el gen análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina y un promotor inducible por fermentación que implica etapas discontinuas y semicontinuas y aislamiento y purificación de la proteína expresada de los cultivos.

En un aspecto de la invención, se obtiene un proceso de plegamiento para un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención, en donde la expresión del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa está en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli* recombinantes. En una modalidad, se usa la desnaturalización seguida de plegamiento en un sistema redox.

Los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa de la invención pueden usarse en un método para escindir proteínas que tienen un sitio de escisión de enteroquinasa, y especialmente proteínas de fusión que tienen tal un sitio de escisión modificado en su secuencia. Las cantidades necesarias se determinan fácilmente de manera empírica por un experto en la técnica.

El término "proteína de fusión", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína creada mediante ingeniería genética a partir de dos o más proteínas o péptidos. Como se usa en la presente descripción, una proteína de fusión puede referirse a una proteína en la que se ha introducido intencionalmente una secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (D4K) para una escisión específica. Generalmente, la escisión de la proteína de fusión genera dos polipéptidos. Una proteína de fusión de acuerdo con la invención puede ser una proteína de fusión recombinante. En modalidades particulares, se puede generar una proteína de fusión, por ejemplo, a partir de la adición de un péptido de residuo derivado de un vector en un terminal, por ejemplo el N-terminal, además de la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje de interés. De esta manera, por ejemplo, se puede construir una proteína de fusión recombinante para que tenga un sitio de escisión Asp-Asp-Asp-Lys (D4K) en el vector corriente arriba unida a la proteína de interés.

El término "operativamente enlazado" denota en la presente descripción una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia polinucleotídica de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

El término "proteasa" pretende incluir cualquier polipéptido/s, solo o en combinación con otros polipéptidos, que rompen enlaces peptídicos entre los aminoácidos de proteínas.

El término "actividad proteolítica" se refiere a la actividad de escisión de un sustrato por una enzima. En modalidades particulares, el término se refiere a la escisión enzimática por enteropeptidasas. En modalidades ilustrativas, el término se refiere a la actividad específica de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención para sitios de escisión Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. "Actividad proteolítica no específica" se refiere a la actividad de escisión que no se dirige a un sitio de escisión específico. "Actividad proteolítica específica" se refiere a la actividad de escisión que se dirige a un sitio de escisión específico.

De hecho, como se describe en la presente descripción, un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención es superior para la escisión de proteínas de fusión en comparación con la forma de dos cadenas derivada de bovino.

Como otro aspecto de la invención, el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa de la invención se incorpora como una de las proteínas de fusión asociadas a otra proteína más. Como tal, con la adición de una cantidad mínima de actividad de enteroquinasa exógena al recipiente de reacción, la proteína de fusión da como resultado la liberación de actividad de enteroquinasa adicional que a su vez puede catalizar muchas más escisiones proteolíticas de proteínas de fusión. De esta manera, pueden producirse grandes cantidades de actividad de enteroquinasa a partir de una proteína de fusión de manera autocatalítica.

Otro aspecto particular de la invención enseña un método para la escisión de una proteína que contiene un sitio de escisión Asp-Asp-Asp-Asp-Lys mediante el uso de cualquiera de los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención descritos en la presente descripción, el método que comprende poner en contacto la proteína con cualquiera de los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención, y en donde el contacto de la proteína con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina da como resultado una escisión específica.

En una modalidad, la proteína es una proteína de fusión. En otra modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión recombinante. En una modalidad adicional, la proteína se produce de manera bacteriana. En una modalidad más particular, la proteína es una proteína sintética.

En un aspecto adicional, la invención enseña un método para la preparación de proteína recombinante mediante el uso de cualquiera de los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la invención como se describe en la presente descripción, el método que comprende proporcionar una proteína de fusión recombinante que contiene un sitio de escisión Asp-Asp-Asp-Asp-Lys y poner en contacto la proteína de fusión con cualquiera de los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de la invención, en donde el contacto de la proteína de fusión recombinante con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina da como resultado la escisión específica de Asp-Asp-Asp-Asp-Lys y la preparación de proteína recombinante.

Todos los encabezamientos y sub-encabezamientos se usan en la presente solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

5 En la presente descripción se ha desarrollado un proceso de producción para fabricar análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina. Los análogos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina se fusionaron con la etiqueta de tiorredoxina expresados como cuerpos de inclusión en *E. coli*. Después del replegamiento y la autoactivación, el análogo activo de la cadena ligera de la enteroquinasa se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico Q HP. Además, se encontró que las sustituciones triples (C112A, L134K e I135K) de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina (EK_{LM}), que mejoraron las propiedades hidrofílicas de la superficie, aumentó 4 veces el rendimiento del replegamiento sin perder actividad. El rendimiento del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa purificado fue 800 mg/l de un cultivo de 4 g/l, y la actividad específica se determinó como 5000 ± 10 EU/mg. Así, nuestro proceso de producción del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa proporciona una herramienta valiosa para procesar proteínas de fusión terapéuticas y otras proteínas de fusión.

Abreviaturas:

20 EK: Enteroquinasa
 EK_L: Cadena ligera de la enteroquinasa bovina con mutación C112A
 EK_{LM} (alternativamente denominada en la presente descripción EK_M o EK_{LM}(C112A, L134K, I135K)): Cadena ligera de la enteroquinasa bovina con mutaciones en las posiciones 112 a Ala, 134 a Lys y 135 a Lys.
 25 TrxEK_{LM} : EK_{LM} fusionada con etiqueta de tiorredoxina N-terminal con un enlazador de 12AA
 Trx-Enlazador-EK_{LM} : EK_{LM} fusionada con etiqueta de tiorredoxina N-terminal con un enlazador más largo de 49AA
 30 Trx-Enlazador-EK_L : EK_L fusionada con etiqueta de tiorredoxina N-terminal con un enlazador más largo de 49AA
 IPTG: Isopropil β-D-1-tiogalactopirananósido
 Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
 35 DTT: Ditioneitol
 GSSG: Disulfuro de glutatión
 40 GSH: Glutatión
 FDM: Medio definido de fermentación
 Trx: Tiorredoxina
 45 LC-MS: Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas
 SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
 50 BL21: *E. coli* cepa *E. coli* B BL21 DE3
 Reacción de PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
 PEG bajo: Polietilenglicol de bajo peso molecular tal como polietilenglicoles con un peso molecular de hasta 1000
 55 PEG1000: Polietilenglicol 1000, un polietilenglicol con un peso molecular aproximado de 1000.

Ejemplo 1. Construcción de plásmido de Trx-enlazador-EK_L y Trx-enlazador-EK_{LM}

60 La secuencia de ADN que codifica la subunidad catalítica de la enteroquinasa bovina se amplificó con los siguientes cebadores:

5'-ggcgggtaccgacgacgacgacaagattgtcggaggaagtgac-3' SEQ ID NO: 2

65 5'- gccgaattcctaattgtagaaaactttgtatccactctgtgaacc-3' SEQ ID NO: 3

Estos dos cebadores contenían sitios para las enzimas de restricción Kpn I y EcoR I, respectivamente. El fragmento diana se introdujo en pET32a (Novagen) desde el sitio KpnI y EcoRI. La reacción de PCR de rutina se realizó mediante el uso de la ADN polimerasa *Pfu* de Stratagene. La secuencia del plásmido pET32a-EK_L se confirmó mediante secuenciación. Se introdujeron tres sitios de sustitución, es decir, C112A, L134K, I135K mediante el uso del kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange® XL de Stratagene con los cebadores:

C112AF 5'-acacagattatatacagcctat tgcgttaccagaagaaatcaag-3' **SEQ ID NO: 4**

C112AR 5'-cttgatttctctggaacgcaataggctgtatataatctgtgt-3' **SEQ ID NO: 5**

L134K,I135KF 5'-ctattgctggctggggggcaagaaatcaaggttctactgcagacg-3' **SEQ ID NO: 6**

L134K,I135KR5'-cgtctgcagtagaacctgatatttcttcccc ccagccagcaatag-3' **SEQ ID NO: 7**

15 **Secuencia de aminoácidos de Trx-enlazador-EK_{LM}:**

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL
FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTD
DKIVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRDWLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAVLGLHMASNLTSPIET
RLIDQVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPIALPEENQVFPFGRICSIAGWGAKKYQGSTADVLQEADVP
LLSNEKCCQQMPEYNITENMVCAGYEAGGVDSQGGSLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARV
PRFTEWISFLH

SEQ ID NO: 8

Subrayada: Trx; Regular: enlazador; ***Negrita cursiva:*** EK_{LM}

25 **Secuencia de aminoácidos de Trx-EK_{LM}:**

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL
FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGGTDDDDKIVGGSDSREGAWPWVVALYFDDQQVCGASLVSRD
WLVSAAHCVYGRNMEPSKWKAVLGLHMASNLTSPIETRLIDQVINPHYNKRRKNNDIAMMHLEMKVNYTDYIQPI
ALPEENQVFPFGRICSIAGWGAKKYQGSTADVLQEADVPLLSNEKCCQQMPEYNITENMVCAGYEAGGVDSQGGD
SGGSLMCQENNRWLLAGVTSFGYQCALPNRPGVYARVPRFTEWISFLH

SEQ ID NO: 9

Subrayada: Trx; Regular: enlazador; ***Negrita cursiva:*** EK_{LM}

40 **Ejemplo 2. Fermentación y expresión de Trx-enlazador-EK_L y Trx-enlazador-EK_{LM}**

Se inocularon células de una solución madre de glicerol en una placa EC1, se cultivaron durante toda la noche a 37 °C y se lavaron con cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % para suspender las células. Se dejó que el cultivo creciera en un fermentador que contenía medio definido de fermentación (FDM) a 37 °C durante 16 horas, y se indujeron con IPTG 1,0 mM a una OD600 de 150, y luego se cultivó durante 6 horas a 37 °C antes de cosechar por centrifugación.

Ambos Trx-enlazador-EK_L y Trx-enlazador-EK_{LM} en *E. coli* BL21 se expresaron en fermentación semicontinua. Como se muestra en la Figura 1, no se observó expresión aparente de fuga juzgada por la SDS-PAGE antes de la inducción con IPTG. Apareció una banda inducida por IPTG justo por encima de 43 kD en SDS-PAGE, y se confirmó mediante LC-MS que esta banda representaba la proteína diana. Además, el nivel de expresión de la proteína diana fue dependiente del tiempo de inducción. Con 4 horas o 6 horas de inducción para Trx-enlazador-EK_L y Trx-enlazador-EK_{LM} mediante el uso de medio definido de fermentación (FDM), respectivamente, se obtuvo una expresión aceptable, y se logró ~ 4 g/l de las proteínas diana.

55 **Ejemplo 3. Replegado, activación autocatalítica y purificación**

Las células de la fermentación se resuspendieron en tampón de lisis (1:10, p/p) que contenía Tris 20 mM, pH 8,0, y se lisaron mediante prensa francesa. Los cuerpos de inclusión se sedimentaron a 20 000 g durante 1 hora a 4 °C, y luego se lavó una vez con el uso de tampón de lisis. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 3,2 mg/ml en tampón que contenía Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM y se incubaron a 4 °C durante 3 horas. Después de centrifugar a 20 000 g durante 30 min, la EK solubilizada (es decir, Trx-enlazador-EK_L y/o Trx-enlazador-EK_{LM}) se diluyó 80 veces en tampón de replegamiento que contenía Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3 y se incubó a 20 °C durante 24 horas.

Durante la dilución e incubación del procedimiento de replegamiento, se produjo la escisión autocatalítica y se liberó la enzima completamente activa sin la etiqueta de tiorredoxina (Trx). Finalmente, la enzima se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico Q HP.

5 El esquema del proceso se muestra en la Figura 2. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en el tampón que contenía urea 5-8 M y DTT 10-20 mM. Cabe señalar que la concentración de los cuerpos de inclusión afectó al rendimiento del replegamiento. Se encontró que el rendimiento del replegamiento de 4 mg/ml de Trx-enlazador-EK_{LM} fue 2 veces mayor que el de 6 mg/ml de Trx-enlazador-EK_{LM} (Figura 3A).

10 El replegamiento se produjo por dilución. La cantidad de enzima purificada a partir de un volumen fijo también fue dependiente de la concentración de Trx enlazador EK en el tampón de replegamiento, y alcanzó un máximo cuando la concentración de Trx-enlazador-EK_{LM} fue de 120 µg/ml.

15 La activación autocatalítica se produjo de manera concomitante con el proceso de replegamiento. La EK activa se liberó de Trx-enlazador-EK por la EK activa de escape, que escindió específicamente la etiqueta de Trx en el sitio de reconocimiento de DDDDK justo antes de la EK madura. El proceso de replegamiento y activación autocatalítica pareció óptimo a las 48 horas (Figura 4). Considerando la inhibición de EK por urea, se encontró que el rendimiento del replegamiento se redujo en gran medida si estaba por encima de 2 M de urea en tampón de replegamiento. Nuestro resultado mostró que la urea 1 M en tampón de replegamiento fue óptima (Figura 5).

20 El rendimiento de replegamiento fue dependiente del sistema redox. Se encontró que GSSG/GSH en la relación 1:3 fue óptima y mejor que Cistina/cisteína (Figura 6).

25 La EK activa después del replegamiento y la autoactivación se purificó y se concentró mediante purificación cromatográfica de intercambio aniónico en una etapa (columna QHP, Figura 7A). Se encontró que la etiqueta de Trx estaba en P1, EK_{LM} estaba principalmente en P2 junto con la impureza de la etiqueta de Trx, y P3 contenía cantidades trazas de EK_{LM}, que se confirma mediante el ensayo de actividad mostrado en la Figura 7C. Cabe señalar que EK_{LM} de alta pureza (>90 %) se obtuvo mediante purificación adicional de P2 mediante el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Figura 7B). Además, la actividad enzimática de cada fracción también se ensayó (Figura 7C) y se agrupó. Para Trx-enlazador-EK_L, el rendimiento de replegamiento fue bastante bajo más allá de 40 µg/ml de Trx-enlazador-EK_L durante el proceso de replegamiento (4,4 % a 40 µg/ml), lo que dificultaba prácticamente este proceso. En otras palabras, se requiere un tanque de almacenamiento enorme para producir una gran cantidad de EK (~ 1000 g).

35 El bajo rendimiento de replegamiento podría deberse a la agregación de proteínas causada por interacciones hidrofóbicas de proteínas. Después del mapeo de hidrofobicidad superficial de EK_L basado en su estructura 3D, se encontró que el ¹³³ALIY es uno de los parches más hidrofóbicos de la superficie. Por tanto, EK_{LM} con 3 sustituciones (C112A, L134K e I135K) se construyó y se sometió a estudio. Mediante el uso de exactamente el mismo proceso, EK_{LM} mejoró enormemente el rendimiento de replegamiento, especialmente cuando la concentración de EK_{LM} en el tampón de replegamiento fue superior a 40 µg/ml, que es el punto débil para la producción a gran escala de EK_L (Figura 3A). Como se muestra en la Figura 3A, a 40 µg/ml de concentración de Trx-enlazador-EK_{LM} en el tampón de replegamiento, el rendimiento de replegamiento de Trx-enlazador-EK_{LM} (17 %) fue 4 veces mayor que el de Trx-enlazador-EK_L (4,4 %). Además, ~ 16 mg de EK_{LM} activa podría purificarse con un tanque de replegamiento de 1l en el que la concentración de EK_{LM} es de 120 µg/ml.

45 La actividad enzimática específica entre EK_L y EK_{LM} se comparó como en la Figura 8. Las triples sustituciones de EK_{LM} no tuvo ningún efecto aparente sobre la actividad enzimática, lo que se puso de manifiesto por el hecho de EK_L y EK_{LM} tienen bandas similares en SDS-PAGE si se aplican con la misma actividad. Además, EK_{LM} era bastante estable si se almacenaba en tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 200 mM a -80 °C o 4 °C. No se observó degradación aparente ni disminución de la actividad hasta los 3 meses (Figura 9).

Ejemplo 4. Ensayos de enzimas

55 La actividad enzimática se midió directamente mediante el uso de un sustrato fluorogénico, GDDDK-Beta-naftilamida. La reacción se inició con la adición de 1 µl de muestra en cada pocillo de una placa fluorescente de 96 pocillos que contenía 100 µl de tampón de reacción. Después de mezclar durante 10 segundos, se midió la fluorescencia con Fluostar OPTIMA (excitación a 340 nM y emisión a 420 nM). La actividad enzimática se definió por unidad arbitraria (EU), que se deriva de la pendiente*60/30 000, donde la pendiente representa el intervalo lineal.

60 Ejemplo 5. Región enlazadora

Dos secuencias de aminoácidos de EK_{LM} se produjeron conectadas a trx donde la región enlazadora difería, trxEK_{LM} y trx-enlazador-EK_{LM} (ver figura 10). En trx-enlazador-EK_{LM} el espaciador entre trx y EK_{LM} es 37 aminoácidos más largo que en trxEK_{LM}.

65 **TrxEK_{LM}**

Ruptura celular y solubilización de IB

7,41 g de sedimento celular de TrxEK_{LM} se resuspendió en 100 ml de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0) y las células se rompieron mediante el uso de un homogeneizador a una presión de 30 000 psi. Después de descartar el sobrenadante, los IB pesaron 3,53 g. Los IB aislados se resuspendieron en 70 ml de tampón de solubilización (Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM (recién añadido)) y se incubaron a 4°C durante 4 horas. Las muestras solubilizadas se clarificaron mediante centrifugación.

Replegado de TrxEK_{LM}

Se diluyeron 16 ml de solución de IB en 500 ml de tampón de replegamiento (Tris 20 mM, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, urea 1 M, pH 8,0) y se agitó a 20°C durante 54 horas. La concentración de proteína durante el replegamiento es de 60 µg/ml.

Purificación de TrxEK_{LM}

Columna:	Columna Q HP
Tampón de muestra:	Tris 20 mM, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, DTT 0,62 mM, urea 1 M, pH 8,0
Tampones:	Tampón A: Tris 20 mM, pH 8,0 Tampón B: Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0
Procedimiento:	10 CV 100 % A Aplicación a 10 ml/min 5 CV 100 % A 7 CV 0 % B-70 % B 1 CV 70 % B-100 % B 1,5 CV 100 % B
Volumen de columna:	28 ml
Velocidad:	10ml/min

Las fracciones de elución con mayor actividad enzimática se combinaron dando como resultado un volumen agrupado de 30 ml y una actividad enzimática total de 14 100 EU. La cantidad de proteína fue 2,82 mg.

Trx-enlazador-EK_{LM}

Ruptura celular y solubilización de IB

66,9 g de sedimento celular de Trx-enlazadorEK_{LM} se resuspendió en 1000 ml de tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0) y las células se rompieron mediante el uso de un homogeneizador a una presión de 30 000 psi. Después de descartar el sobrenadante, los IB pesaron 22 g y se lavaron una vez con 1000 ml de Tris 20 mM, pH 8,0. Después del lavado, la solución de IB se dividió en 6 botellas para centrifugación. Después de descartar el sobrenadante, se añadieron 41 ml de tampón de solubilización (Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM (recién añadido)) en una botella y se incubaron a 4°C durante 3 horas. Los IB solubilizados se clarificaron mediante centrifugación y el volumen final fue de 43 ml.

Replegado de Trx-enlazador-EK_{LM}

Se diluyeron 9 ml de solución de IB en 500 ml de tampón de replegamiento (Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,0) y se agitó a 20°C durante 18 horas. La concentración de proteína durante el replegamiento fue de 60 µg/ml.

Purificación de Trx-enlazador-EK_{LM}

Columna:	Columna Q HP
Tampón de muestra:	Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, DTT 0,296 mM, pH 8,0
Tampones:	Tampón A1: Tris 20 mM, urea 1 M, pH 8,0 Tampón A2: Tris 20 mM, pH 8,0 Tampón B: Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0
Procedimiento:	10 CV 100 % A1 Aplicación a 10 ml/min 5 CV 100 % A1 5 CV 100 % A2 7 CV 0 % B-70 % B (100 % A2-30 % A2) 1 CV 70 % B-100 % B (30 % A2-0 % A2) 1,5 CV 100 % B

Volumen de columna: 28 ml
 Velocidad: 10 ml/min

5 La actividad enzimática de las fracciones de elución 18-23 es más alta que las otras fracciones a través de la prueba de actividad. Las fracciones de elución con mayor actividad enzimática se combinaron dando como resultado un volumen agrupado de 30 ml y una actividad enzimática total de 24 900 EU. La cantidad de proteína fue 4,98 mg.

Resultado:

10 Se produjeron 2,82 mg de proteína EK_{LM} a partir de 0,5 l de solución de replegamiento cuando se usó TrxEK_{LM} cuando la concentración de proteína fue de 60 µg/ml durante el replegamiento, mientras que se produjeron 4,98 mg de proteína EK a partir de la versión Trx-enlazador-EK_{LM} en las mismas condiciones. Por tanto, la proteína de fusión con un enlazador más largo mostró un 76 % más de eficiencia de replegamiento que la proteína de fusión con un enlazador más corto.

Ejemplo 6: Optimización de los componentes del tampón de replegamiento

20 Varios aditivos diferentes, que incluyen detergentes, ciclodextrinas, aminoácidos, PEG (polietilenglicol) y azúcares, se combinaron en el tampón de replegamiento actual (Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8,3) individualmente para probar su capacidad de mejorar la eficiencia de replegamiento de Trx-enlazador-EK_{LM}. El proceso de replegamiento se realizó como se describió en el Ejemplo 3 con pequeñas modificaciones. Brevemente, los cuerpos de inclusión se solubilizaron a 7,3 mg/ml en el tampón que contenía Tris 20 mM, urea 8 M, pH 8,0, DTT 20 mM, y luego la Trx-enlazador-EK_{LM} solubilizada se añadió al tampón de replegamiento optimizado que contenía cierto aditivo en una dilución de 20 veces. La mezcla se incubó a 4°C durante 20 horas y la cantidad de Trx-enlazador-EK_{LM} correctamente replegado se cuantificó mediante un ensayo de actividad de proteasa como se describió en el Ejemplo 4.

30 Tanto PEG bajo (por ejemplo, PEG1000, 1 %) como hidroxipropil-β-ciclodextrina (1,5 %) mostraron una gran capacidad para potenciar la eficiencia de replegamiento de Trx-enlazador-EK_{LM}, con un aumento de 57,9 % y 106,2 %, respectivamente, con respecto al tampón de replegamiento de urea solo (como se muestra en la figura 11). Estos dos aditivos no tienen un impacto obvio en la maduración de EK_{LM} y el siguiente proceso de purificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Novo Nordisk A/S
 <120> CADENA LIGERA DE ENTEROQUINASA MODIFICADA
 40 <130> 8378.204-WO
 <150> PCT/CN2011/002169
 <151> 2011-12-23
 45 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.5
 50 <210> 1
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Cadena ligera de la enteroquinasa bovina
 55 <400> 1

60

65

ES 2 819 288 T3

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

<210> 2
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 10 ggcggtaccg acgacgacga caagattgtc ggaggaagtg ac 42
 <210> 3
 <211> 44
 <212> ADN
 15 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 3
 ggcgaattcc taatgtagaa aactttgtat ccactctgtg aacc 44
 <210> 4
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 4
 acacagatta tatacagcct attgcgttac cagaagaaaa tcaag 45
 <210> 5
 <211> 45
 35 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 5
 ctgatttc ttctggaac gcaataggct gtatataatc tgtgt 45
 45 <210> 6
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 55 ctattgctgg ctggggggca aagaatatc aaggttctac tgcagacg 48
 <210> 7
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 65 cgtctgcagt agaacctga tatttcttc ccccagcca gcaatag 47

ES 2 819 288 T3

<210> 8
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> trx-enlazador-EKLM

<400> 8

10

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30

20

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45

25

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60

30

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80

35

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

40

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly

45

50

55

60

65

ES 2 819 288 T3

				100					105					110			
5	Ser	Gly	His	Met	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	
			115					120					125				
10	Arg	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	
		130					135					140					
15	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ile	Val	
	145					150					155					160	
20	Gly	Gly	Ser	Asp	Ser	Arg	Glu	Gly	Ala	Trp	Pro	Trp	Val	Val	Ala	Leu	
					165					170					175		
25	Tyr	Phe	Asp	Asp	Gln	Gln	Val	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Asp	
			180						185					190			
30	Trp	Leu	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Val	Tyr	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Pro	
			195					200					205				
35	Ser	Lys	Trp	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	His	Met	Ala	Ser	Asn	Leu	Thr	
		210					215					220					
40	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu	Thr	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Ile	Val	Ile	Asn	Pro	
	225					230					235					240	
45	His	Tyr	Asn	Lys	Arg	Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Ala	Met	Met	His	Leu	
				245						250					255		
50	Glu	Met	Lys	Val	Asn	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ile	Gln	Pro	Ile	Ala	Leu	Pro	
			260						265					270			
55	Glu	Glu	Asn	Gln	Val	Phe	Pro	Pro	Gly	Arg	Ile	Cys	Ser	Ile	Ala	Gly	
			275					280					285				
60	Trp	Gly	Ala	Lys	Lys	Tyr	Gln	Gly	Ser	Thr	Ala	Asp	Val	Leu	Gln	Glu	
		290					295					300					
65	Ala	Asp	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Asn	Glu	Lys	Cys	Gln	Gln	Gln	Met	Pro	
	305					310					315					320	
70	Glu	Tyr	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn	Met	Val	Cys	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ala	Gly	
				325						330					335		
75	Gly	Val	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Cys	Gln	
			340						345					350			

ES 2 819 288 T3

Glu Asn Asn Arg Trp Leu Leu Ala Gly Val Thr Ser Phe Gly Tyr Gln
355 360 365

5

Cys Ala Leu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Arg Val Pro Arg Phe
370 375 380

10

Thr Glu Trp Ile Gln Ser Phe Leu His
385 390

15 <210> 9
<211> 356
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Trx-EKLM

<400> 9

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 819 288 T3

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

ES 2 819 288 T3

				165					170					175		
5	Val	Leu	Gly	Leu	His	Met	Ala	Ser	Asn	Leu	Thr	Ser	Pro	Gln	Ile	Glu
				180					185					190		
10	Thr	Arg	Leu	Ile	Asp	Gln	Ile	Val	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	Asn	Lys	Arg
			195					200					205			
15	Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Ala	Met	Met	His	Leu	Glu	Met	Lys	Val	Asn
		210					215					220				
20	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ile	Gln	Pro	Ile	Ala	Leu	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Val
	225					230					235					240
25	Phe	Pro	Pro	Gly	Arg	Ile	Cys	Ser	Ile	Ala	Gly	Trp	Gly	Ala	Lys	Lys
					245					250					255	
30	Tyr	Gln	Gly	Ser	Thr	Ala	Asp	Val	Leu	Gln	Glu	Ala	Asp	Val	Pro	Leu
			260						265					270		
35	Leu	Ser	Asn	Glu	Lys	Cys	Gln	Gln	Gln	Met	Pro	Glu	Tyr	Asn	Ile	Thr
			275					280					285			
40	Glu	Asn	Met	Val	Cys	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Cys
		290					295					300				
45	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Cys	Gln	Glu	Asn	Asn	Arg	Trp
	305					310					315					320
50	Leu	Leu	Ala	Gly	Val	Thr	Ser	Phe	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ala	Leu	Pro	Asn
					325					330					335	
55	Arg	Pro	Gly	Val	Tyr	Ala	Arg	Val	Pro	Arg	Phe	Thr	Glu	Trp	Ile	Gln
				340					345					350		
60	Ser	Phe	Leu	His												
			355													

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, en donde dicho análogo comprende las sustituciones C112A, L134K e I135K, dicho análogo comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1, y dicho análogo tiene actividad de enteroquinasa proteasa.
2. Un método para obtener una solubilidad mejorada en un proceso de renaturalización de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa que comprende la etapa de mutar los aminoácidos hidrofóbicos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 1 a aminoácidos hidrofílicos y opcionalmente mutar otros aminoácidos de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje, en donde los aminoácidos hidrofóbicos sometidos a la mutación están presentes en la superficie de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de tipo salvaje plegada, dicho análogo comprende las sustituciones C112A, L134K e I135K, dicho análogo comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1, y dicho análogo tiene actividad de enteroquinasa proteasa.
3. Un método para la producción de un análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina, en donde el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina es un análogo de acuerdo con la reivindicación 1, y en donde dicho método comprende las etapas:
 - a) cultivar las células huéspedes en un medio de crecimiento que comprende un inductor, en donde las células huéspedes comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa;
 - b) recuperar las células con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa en cuerpos de inclusión;
 - c) solubilizar y replegar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa; y
 - d) purificar el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa.
4. Un método para producir de manera recombinante un péptido o proteína en una célula huésped bacteriana o de levadura, que comprende:
 - a) expresar en levadura o bacteria una proteína de fusión que comprende el péptido o proteína a producir;
 - b) escindir la proteína de fusión con el análogo de la cadena ligera de la enteroquinasa bovina de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - c) aislar el péptido o proteína producida.
5. Un método para producir de manera recombinante un péptido o proteína de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de fusión expresada en la etapa a) comprende además un sitio de escisión Asp-Asp-Asp-Asp-Lys.
6. Un método para producir de manera recombinante un péptido o proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en donde la célula huésped es E. coli.
7. Un método para producir de manera recombinante un péptido o proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el péptido o proteína a producir es un péptido de GLP-1.

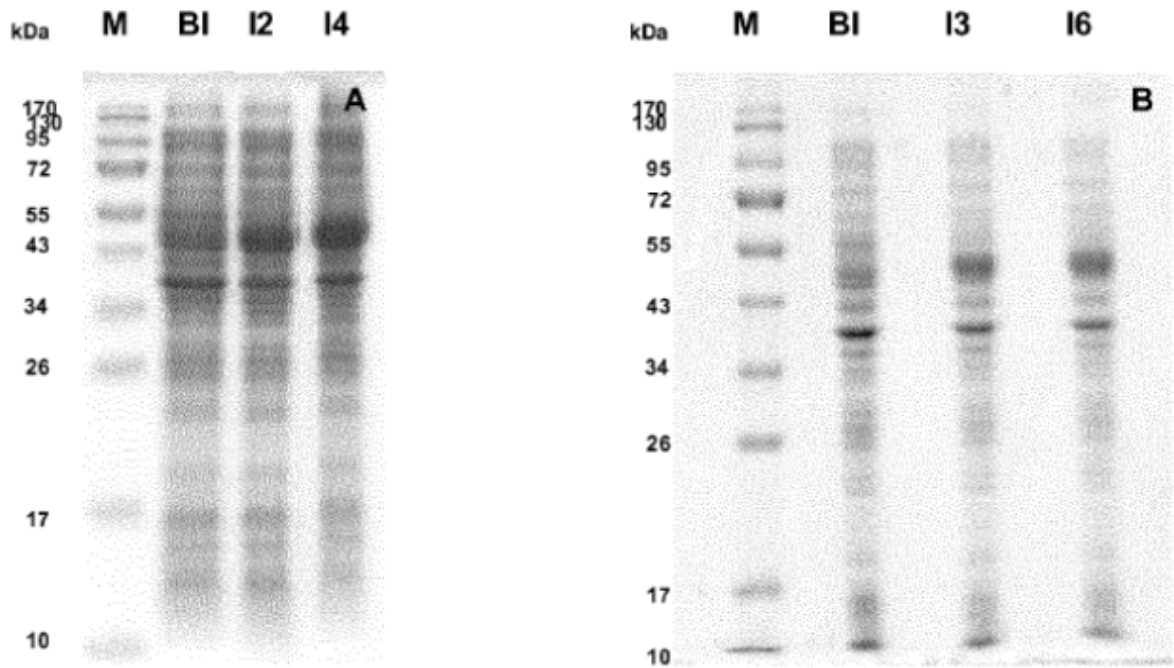


Figura 1

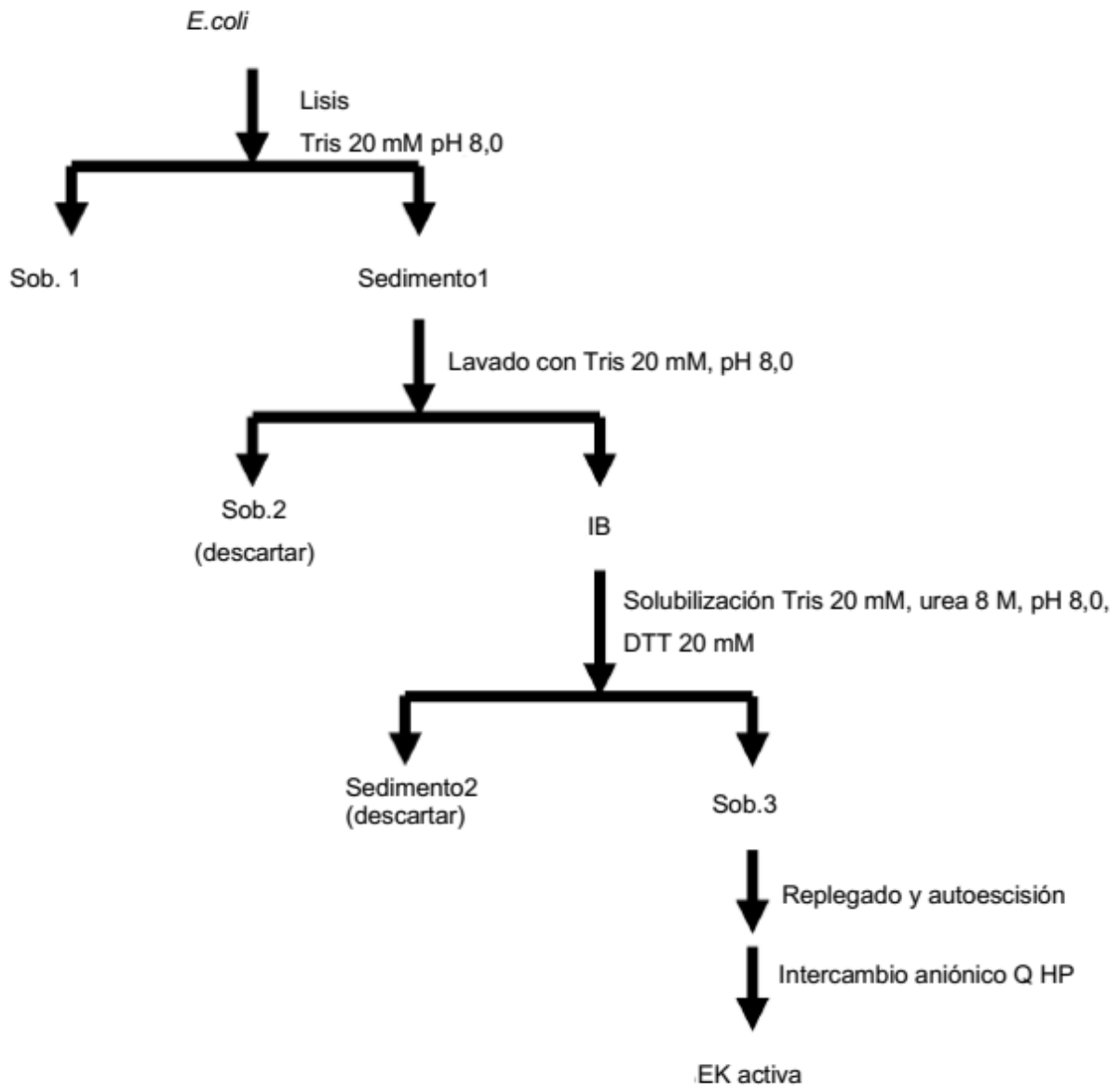
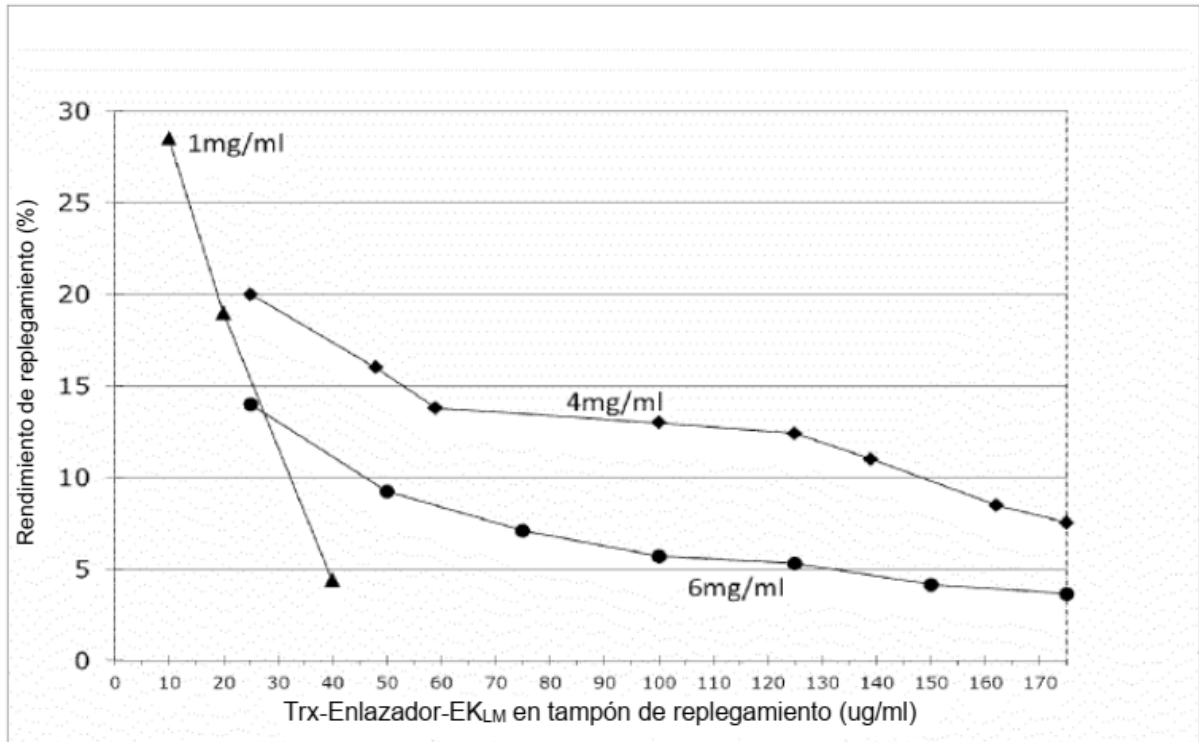
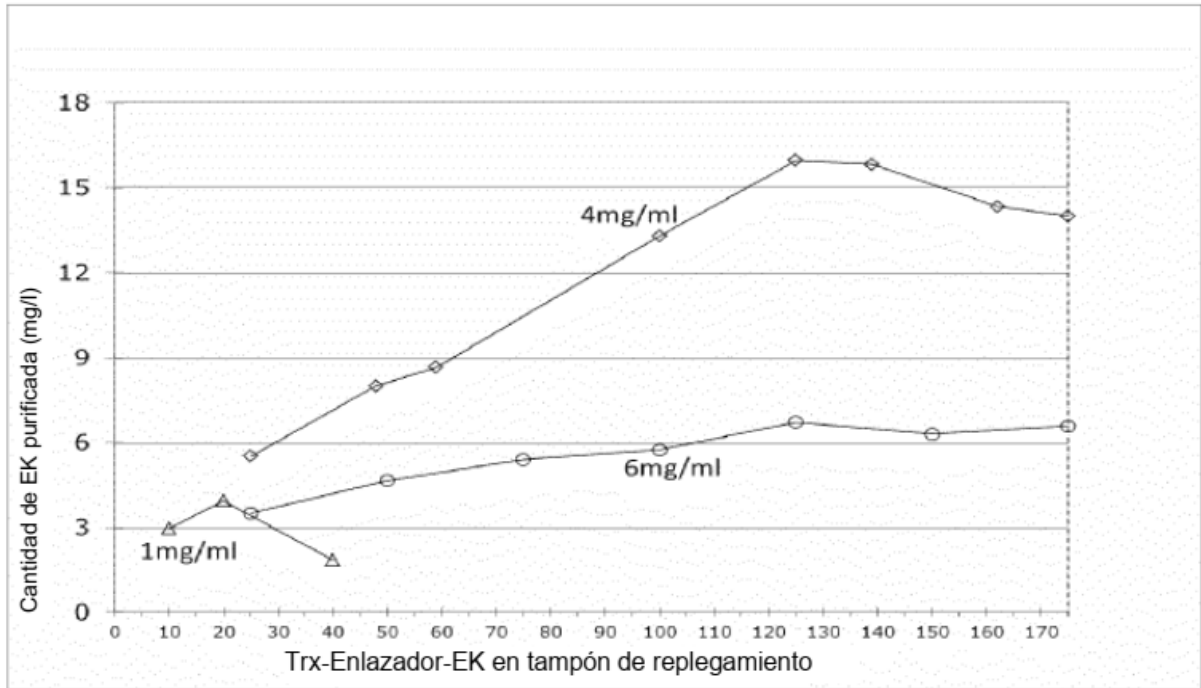


Figura 2



3A



3B

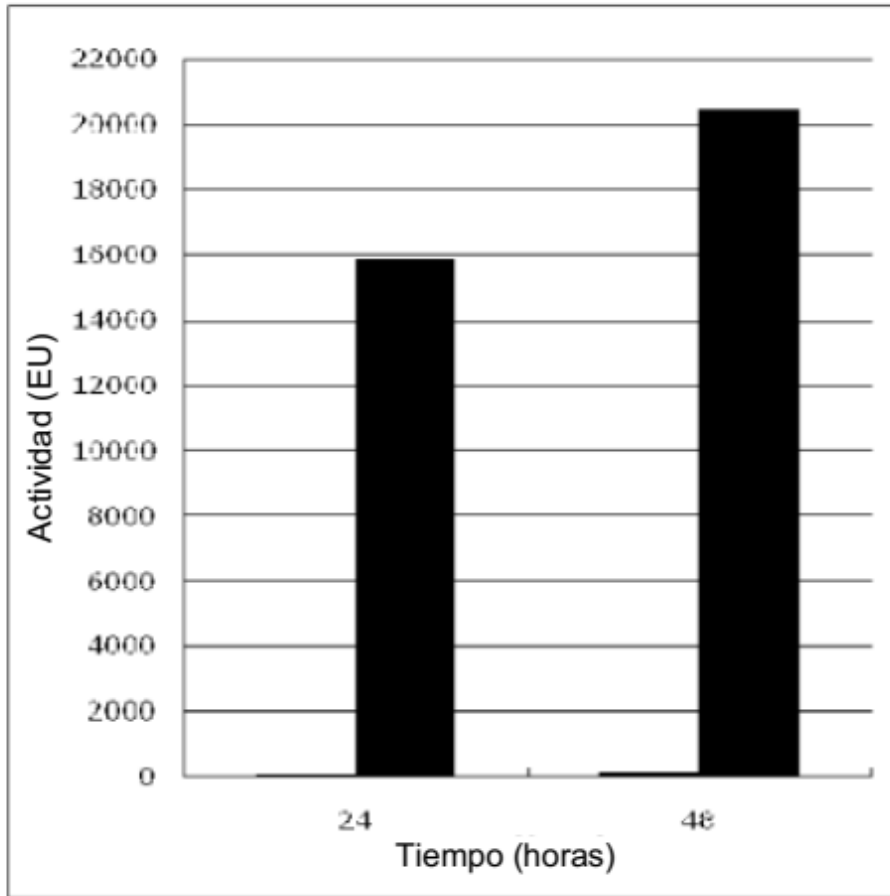


Figura 4

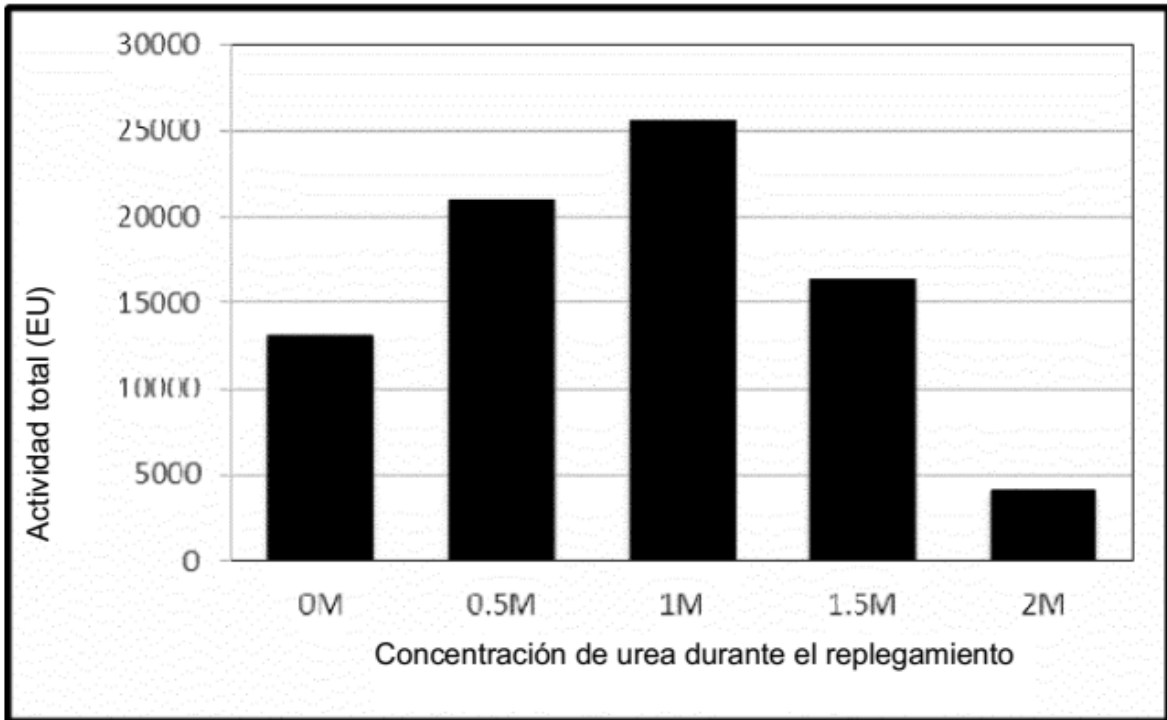


Figura 5

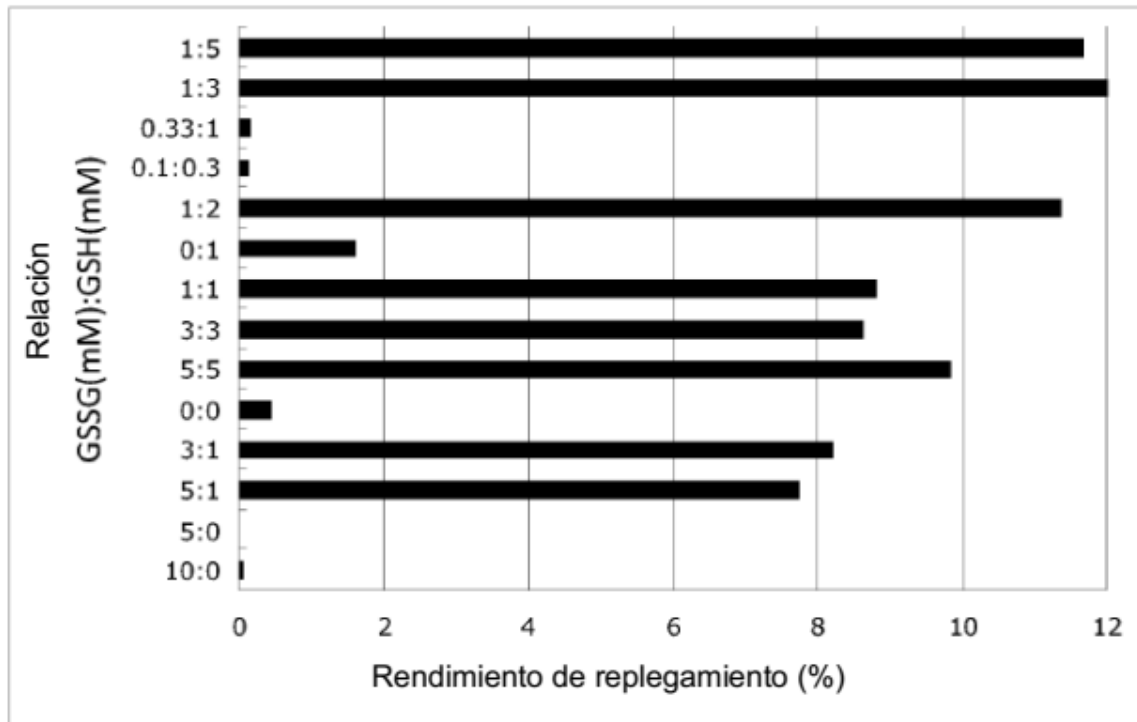


Figura 6

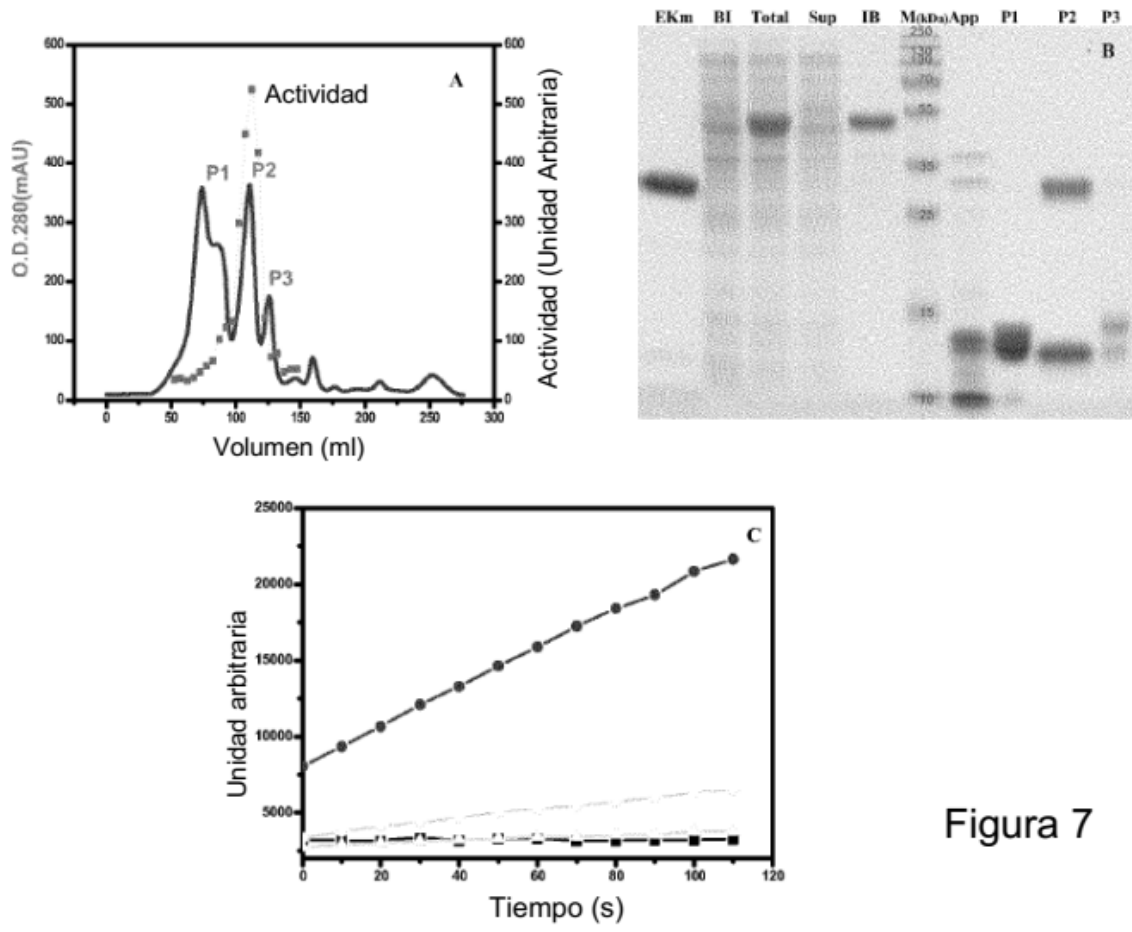


Figura 7

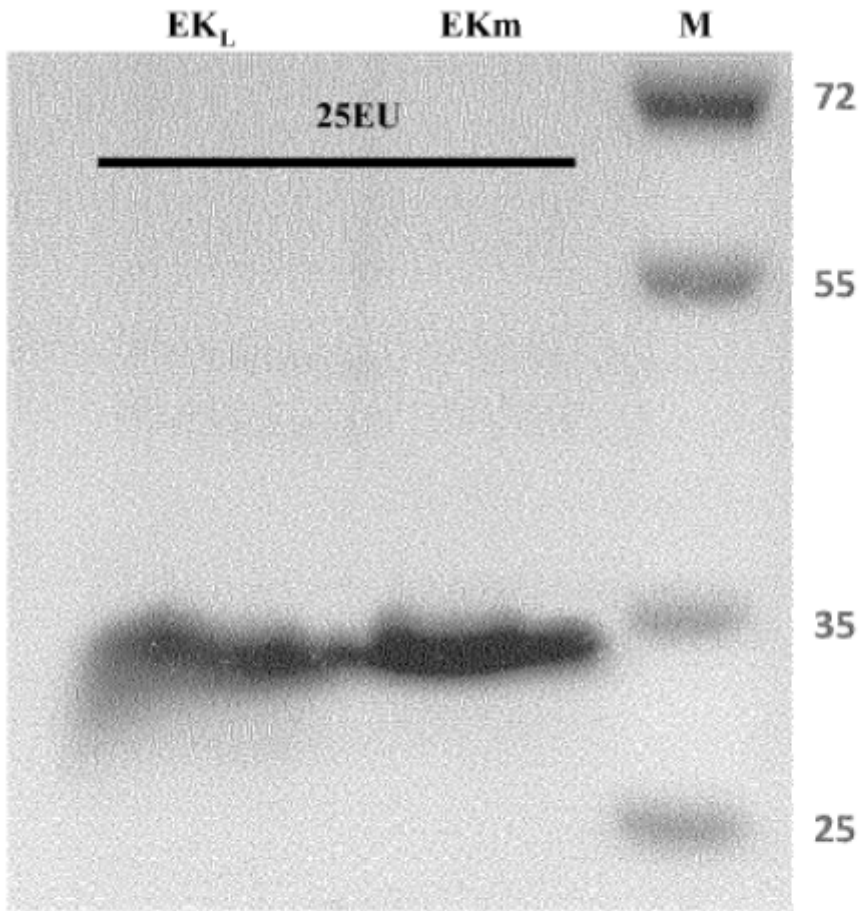


Figura 8

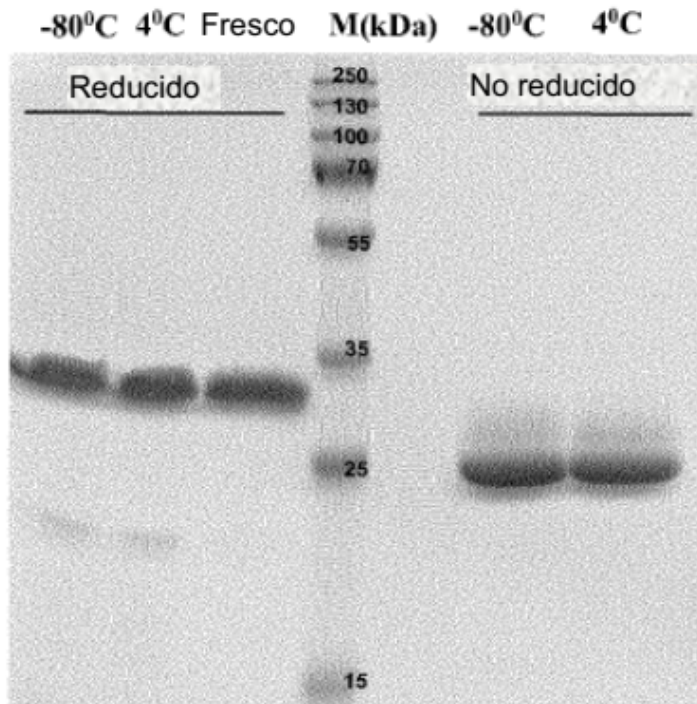


Figura 9

	1					50
Trx-Enlazador-EKLM	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	DGAILVDFWA	EWCGPCKMIA	PILDEIADEY	
Trx-EKLM	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	DGAILVDFWA	EWCGPCKMIA	PILDEIADEY	
	51					100
Trx-Enlazador-EKLM	QGKLTVAKLN	IDQNPGTAPK	YGIRGIPTLL	LFKNGEVAAT	KVGALSKGQL	
Trx-EKLM	QGKLTVAKLN	IDQNPGTAPK	YGIRGIPTLL	LFKNGEVAAT	KVGALSKGQL	
	101					150
Trx-Enlazador-EKLM	KEFLDANLAG	SGSGMHMHHH	HHSSGLVPRG	SGMKETAAAK	FERQHMDSPD	
Trx-EKLM	KEFLDANLAG	SGSG.....	
	151					200
Trx-Enlazador-EKLM	LGTDDDDKIV	GGSDSREGAW	PWVVALYFDD	QQVCGASLVS	RDWLVSAAHC	
Trx-EKLM	.GTDDDDKIV	GGSDSREGAW	PWVVALYFDD	QQVCGASLVS	RDWLVSAAHC	
	201					250
Trx-Enlazador-EKLM	VYGRNMEPSK	WKAVLGLHMA	SNLTSPQIET	RLIDQIVINP	HYNKRRKNND	
Trx-EKLM	VYGRNMEPSK	WKAVLGLHMA	SNLTSPQIET	RLIDQIVINP	HYNKRRKNND	
	251					300
Trx-Enlazador-EKLM	IAMMHLEMKV	NYTDYIQPIA	LPEENQVFPP	GRICSIAGWG	AKKYQGSTAD	
Trx-EKLM	IAMMHLEMKV	NYTDYIQPIA	LPEENQVFPP	GRICSIAGWG	AKKYQGSTAD	
	301					350
Trx-Enlazador-EKLM	VLQEADVPLL	SNEKCQQQMP	EYNITENMVC	AGYEAGGVDS	CQGDSGGPLM	
Trx-EKLM	VLQEADVPLL	SNEKCQQQMP	EYNITENMVC	AGYEAGGVDS	CQGDSGGPLM	
	351					393
Trx-Enlazador-EKLM	CQENNRWLLA	GVTSFGYQCA	LPNRPGVYAR	VPRFTEWIQS	FLH	
Trx-EKLM	CQENNRWLLA	GVTSFGYQCA	LPNRPGVYAR	VPRFTEWIQS	FLH	

Figura 10

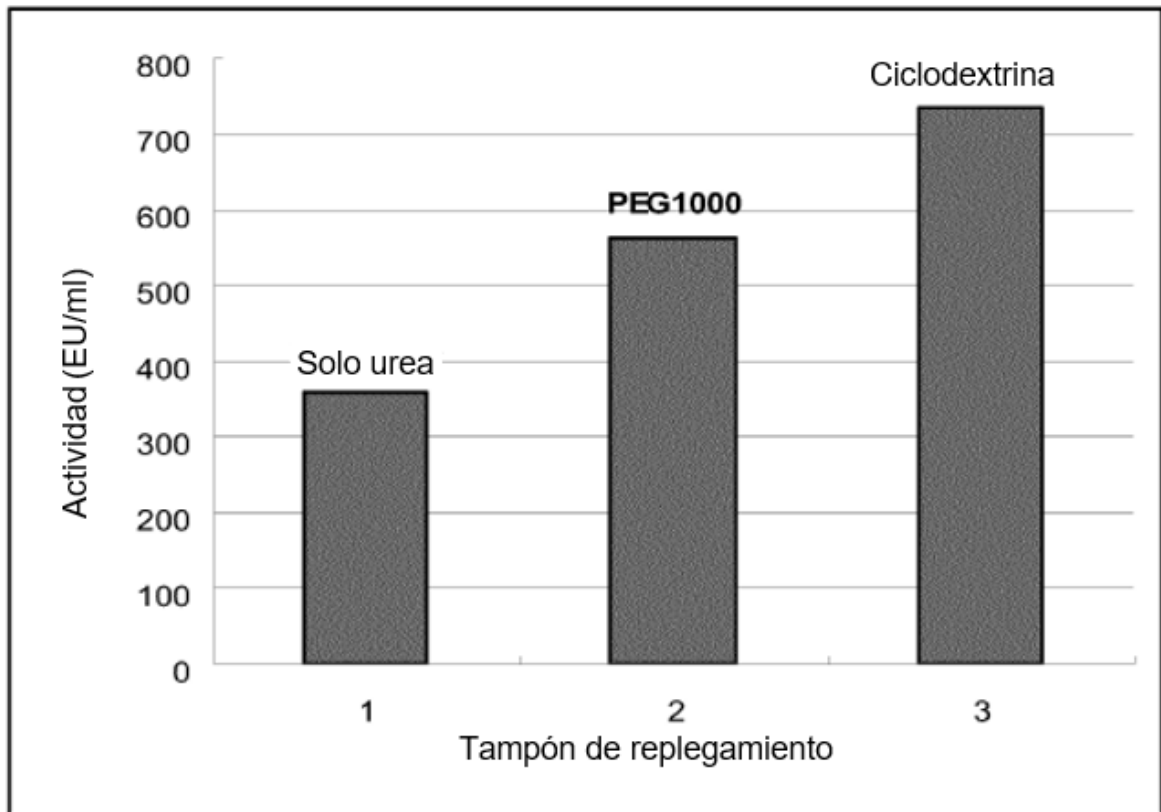


Figura 11