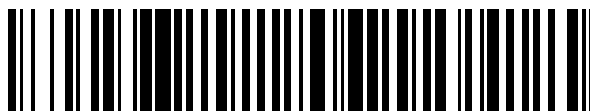


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 856**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/46** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 07805625 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2038423**

54 Título: **Un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tiene actividad insulino-trópica**

30 Prioridad:

**21.06.2006 IN CH10572006**

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

**25.04.2013**

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)  
20TH K.M. HOSUR ROAD, ELECTRONICS CITY  
P.O.  
BANGALORE 560 100 KARNATAKA, IN**

72 Inventor/es:

**MELARKODE, RAMAKRISHNAN;  
SRIRAM, AKUNDI VENKATA;  
SASTRY, KEDARNATH NANJUND;  
VARADARAJALU, LAKSHMI PRABHA y  
SURYANARAYAN, SHRIKUMAR**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 401 856 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

Un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tiene actividad insulínica

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un sistema para producir un péptido insulínico (por ejemplo, Exendina-4) clonando y expresando el péptido nativo o una forma modificada por ingeniería genética del péptido en un microorganismo o microorganismos modificados genéticamente tales como levadura en los que el gen de aminopeptidasa se altera, para permitir una expresión eficaz de la proteína o el polipéptido de longitud completa.

**Antecedentes y técnica anterior de la invención**

Las exendinas son una familia de péptidos que reducen los niveles de glucosa en sangre y tienen alguna similitud de secuencia (53%) con GLP-1 (Goke *et al.*, 1993 J. Biol. Chem. 268; 19650-19655). Las exendinas se encuentran en el veneno del Monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*; Raufman 1996 Reg. Peptides, 61; 1-18) y el lagarto moteado mejicano. La Exendina-4 hallada en el veneno del Monstruo de Gila es de interés particular. El precursor de Exendina-4 es un polipéptido de 87 aminoácidos que incluye señal y proseuencias (Secuencia ID N°: 1). Se procesa para proporcionar la Exendina-4 de 39 aminoácidos amidada (Secuencia ID N°: 2). La solicitud de patente internacional PCT publicada WO 98/35033, describe el ADNc que codifica el péptido proexendina, incluyendo exendina y otros péptidos nuevos, su aislamiento y anticuerpos que reconocen específicamente tales péptidos (Pohl *et al.* 1998, J. Biol. Chem. 273; 9778-9784). Se ha mostrado que la Exendina-4 es un fuerte agonista del receptor de GLP-1 en células de insulinoma de rata aisladas. También tiene una semivida biológica mayor en comparación con GLP-1 (Young *et al.* 1999 Diabetes 48; 1026-1034). Esto puede ser esperado porque el dominio His-Ala de GLP-1 activo (Secuencia ID N°: 3) reconocido por DPP-IV no está presente en Exendina-4, que tiene la secuencia His-Gly en su lugar.

La Exendina-4 proporcionada reduce sistémicamente los niveles de glucosa en sangre en 40% en ratones db/db diabéticos (documento WO 99/07404). La Patente de Estados Unidos 5.424.286 de Eng, describe que una parte considerable de la secuencia N-terminal es esencial para conservar la actividad insulínica.

El número de restos de aminoácidos en una secuencia peptídica tiene una influencia drástica en los costes de producción de péptidos compuestos por química sintética de fase sólida. El coste de fabricar un péptido de 50 unidades es al menos 5 veces mayor que el coste de un péptido de 10 unidades. La síntesis peptídica de fase sólida también requiere el uso de disolventes corrosivos tales como TFS y ácidos fluorhídricos, se requieren varias etapas sintéticas para producir el péptido y purificación posterior del péptido. Por lo tanto, existe la necesidad de un método eficaz y rentable para producir grandes cantidades de Exendina-4 biológicamente activa y otros péptidos insulínicos.

La expresión de una proteína o un polipéptido recombinante en *Pichia* u otros microorganismos no siempre da como resultado la producción exitosa de polipéptido de longitud completa. Con frecuencia, el polipéptido/proteína recombinante heterólogo se somete a escisión/degradación por proteasas de forma intracelular. Dada la estructura de una proteína y la multiplicidad de proteasas presentes en la célula, la especificidad de la secuencia de aminoácidos reconocida por o marcada como objetivo por la proteasa es en muchos casos indeterminada y no está publicada. Por lo tanto, no es posible que un experto en la materia averigüe qué proteasa sería responsable de la escisión/degradación de un polipéptido/proteína recombinante específico. Por ejemplo, se ha indicado que la expresión de endostatina murina o humana en *Pichia* condujo a un producto que carecía de lisina C-terminal (Folkman *et al.*, mayo 1999; 15(7): 563-72). Cuando se alteró el homólogo de *Pichia* del gen *KEX-1* de *Saccharomyces cerevisiae*, el hospedador de *Pichia* secretó endostatina de longitud completa al medio. En otro estudio se indicó que la alteración de *KEX-2*, pero no el gen *YPS-1*, en *Pichia* permitió la producción de gelatina de mamífero, que se escindía en sitios monoarginínicos de la proteína (Werten y de Wolf, Applied and Environmental Microbiology, mayo de 2005; 71 (5): 231 0-7).

La presente invención demuestra la prevención de la escisión proteolítica *in vivo* de proteínas/polipéptidos que tengan los aminoácidos HG (His-Gly) en el extremo N-terminal con la alteración del homólogo del gen *STE 13* de *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia*. Muy específicamente se ha mostrado que el problema asociado con la escisión proteolítica de Exendina-4 extendida con Glicina (GlyExendina-4, precursor de Exendina-4 con glicina C-terminal) se resuelve por alteración del homólogo del gen *STE 13* de *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia*.

El documento WO 1998/01535 describe la producción de un polipéptido con actividad insulínica en levadura que tiene actividad proteasa reducida, no siendo esa proteasa *STE13*.

El documento WO 2005/100388 describe la producción de un polipéptido con actividad insulínica por amidación alfa del polipéptido después de la expresión.

65

El documento WO 2004/078777 describe la preparación de polipéptidos protegidos por proteasa por modificación N-terminal, en la que dicha modificación N-terminal es adición de aminoácidos después de la expresión.

### Objetos de la invención

- 5 El principal objeto de la presente invención es producir un polipéptido biológicamente activo.
- Otro objeto principal de la presente invención es producir un péptido insulínico, Exendina-4.
- 10 Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un método para producir el péptido insulínico.
- Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un método para expresar un polipéptido de longitud completa a partir de la célula hospedadora de *Pichia*.
- 15 Otro objeto más de la presente invención es desarrollar un método para amidar el péptido insulínico.

### Declaración de la invención

- 20 La presente invención se refiere a un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga un sitio de reconocimiento N-terminal His-Gly con actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de: (a) transformar una célula hospedadora modificada genéticamente que tiene supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido; y (b) cultivar la célula hospedadora transformada para producir el polipéptido y (c) alfa-amidar el polipéptido para producir un polipéptido biológicamente activo; y un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga un sitio de reconocimiento N-terminal His-Gly con actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de: (a) transformar una *Pichia pastoris* modificada genéticamente que tiene supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido; y (b) cultivar la *Pichia pastoris* transformada para producir el polipéptido biológicamente activo.

### Descripción detallada de la invención

- 30 La presente invención se refiere a un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de:
- 35 a. transformar una célula hospedadora modificada genéticamente que tiene supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido; y  
 b. cultivar la célula hospedadora transformada para producir el polipéptido; y  
 c. alfa amidar el polipéptido para producir un polipéptido biológicamente activo.
- 40 En otra realización más de la presente invención, la célula hospedadora es célula de levadura.
- En otra realización más de la presente invención, la célula de levadura es *Pichia pastoris*.
- En otra realización más de la presente invención, el gen de proteasa es el gen STE13.
- 45 En otra realización más de la presente invención, el gen de proteasa es dipeptidil peptidasa N-terminal.
- En otra realización más de la presente invención, el método implica cultivar las células transformadas en condiciones que induzcan la expresión del polipéptido.
- 50 La presente invención también se refiere a un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga un sitio de reconocimiento N-terminal His-Gly con actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de:
- 55 a. transformar una *Pichia pastoris* modificada genéticamente que tenga supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido; y  
 b. cultivar la *Pichia pastoris* transformada para producir el polipéptido biológicamente activo.
- En otra realización más de la presente invención, el polipéptido es Glyexendina-4 de SEC ID N° 4.
- 60 En otra realización más de la presente invención, la Glyexendina-4 tiene la secuencia polinucleotídica correspondiente de SEC ID N° 5.
- En otra realización más de la presente invención, el método implica poner en contacto el polipéptido gliexendina-4 con una enzima alfa-amidante C-terminal para producir un polipéptido de exendina-4 alfa-amidado.
- 65 En otra realización más de la presente invención, el polipéptido de exendina-4 alfa-amidado es HEGGTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>.

**Breve descripción de los dibujados adjuntos**

- Figura 1** Una construcción para la expresión de GlyExendina-4 en *Pichia pastoris*.
- 5 **Figura 2** Cromatograma de HPLC que muestra dos picos de GlyExendina-4 – N y N-2 (es decir, GlyExendina-4 escindida en el extremo N-terminal).
- Figura 3** Estrategia para la introducción del sitio de restricción *NdeI* en el fragmento del gen *STE13* del genoma de *Pichia pastoris* por PCR.
- 10 **Figura 4** Una construcción para alteración de la copia genómica del homólogo de *Pichia* del gen *STE13* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 5** Análisis de PCR de productos de PCR alterados potenciales amplificados a partir del ADN genómico de los clones D2, D4, D6, D6, D8, D10, D12 (Carriles 2-7) y GS 115 (Carril 1).
- 15 **Figura 6** Cromatograma de HPLC que muestra GlyExendina-4 de longitud completa del hospedador de *Pichia pastoris* con el gen *STE13* alterado.
- 20 **Figura 7** Cromatograma de HPLC que muestra impurezas N-2 del hospedador de *Pichia pastoris* con *DAP2* alterado.
- Figura 8** Análisis de ESI-TOF del sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* con alteración del gen *STE13*, que muestra la masa de GlyExendina-4.
- 25 **Figura 9** Mapa tríptico de GlyExendina-4.

La presente invención proporciona un sistema para preparar péptidos insulíntricos mediante expresión eficaz de genes heterólogos en microorganismos. Este sistema posibilita la producción recombinante a gran escala de precursores peptídicos tales como GlyExendina-4. El sistema proporciona un medio para producir grandes cantidades de péptidos biológicamente activos sin recurrir a síntesis peptídica de fase sólida. Los péptidos producidos usando el sistema de la invención pueden usarse en la formulación de composiciones farmacéuticas. Los péptidos y composiciones de los mismos pueden usarse en el tratamiento de diabetes mellitus, reducción de la motilidad gástrica, retardo del vaciado gástrico, prevención de la hiperglucemia y reducción del apetito y consumo de alimentos.

30

35

Al producir un péptido insulíntrico por expresión génica heteróloga en un microorganismo, la secuencia polinucleotídica codificante del péptido, preferentemente como parte de un vector, se usa para transformar un microorganismo. La expresión del gen que codifica el péptido insulíntrico se controla por un promotor (por ejemplo, un promotor inducible o un promotor constitutivo). Preferentemente, el promotor es un promotor fuerte, más preferentemente un promotor fuerte inducible, que posibilita la producción de grandes cantidades del péptido insulíntrico. Las células transformadas con el gen pueden ser fúngicas (por ejemplo, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*)). Para expresión en *Pichia pastoris*, el promotor usado para dirigir la expresión del gen es preferentemente el promotor *AUG1*, el promotor *GAP* (un promotor constitutivo fuerte) o el promotor *AOX1* o *AOX2* (un promotor inducible fuerte); y el vector puede derivar de un vector conocido o disponible en el mercado tal como pPIC, pPIC3K, pPIC9K, o pHIL-D. Para expresión en *S. cerevisiae*, el promotor usado puede ser el promotor *CUPI*, el promotor *ADH*, el promotor *TEF1*, o el promotor *GAL*. La secuencia polinucleotídica que codifica el péptido insulíntrico que se expresa puede optimizarse para expresión en el organismo particular (por ejemplo, el uso codónico puede optimizarse para su uso en el microorganismo hospedador). La secuencia polinucleotídica puede incluir opcionalmente secuencias líder, secuencias señal, secuencias pre/pro-peptídicas, marcadores para procesamiento, marcadores para detección o purificación, péptidos de fusión, etc. En ciertas realizaciones, el gen codifica un péptido señal. El péptido señal puede dirigir el procesamiento o la secreción del péptido. En ciertas realizaciones, el péptido señal es el péptido señal de Exendina-4 o el péptido señal de factor mat alfa. En ciertas realizaciones, el gen codifica un propéptido, y el propéptido incluye el propéptido de Exendina-4 nativo o el propéptido del factor Mat alfa (véase documento WO 98/35033; *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 9778-9784, 1998).

40

45

50

55

Las células hospedadoras transformadas se seleccionan con respecto a la presencia del vector (por ejemplo, resistencia a antibióticos, capacidad para crecer en medios que no contienen un nutriente particular) y/o expresión del gen exógeno que codifica el péptido insulíntrico. Las células seleccionadas se cultivan después en condiciones adecuadas para la expresión del gen que codifica el péptido. En ciertas realizaciones, el medio en el que las células se cultivan incluye un agente, tal como metanol, que induce la expresión del gen que codifica el péptido. En otras realizaciones, cuando se usa un promotor constitutivo, no es necesario un agente para inducir la expresión del gen exógeno. La célula hospedadora transformada produce el péptido. Preferentemente, el péptido se procesa de forma apropiada por la célula hospedadora. Es decir, el péptido se pliega de forma apropiada y se modifica postraduccionalmente. En ciertas realizaciones, el péptido se secreta al medio de crecimiento. El péptido

60

65

producido de forma recombinante se aísla y purifica después de las células hospedadoras o del medio, si el péptido se ha secretado. El péptido purificado puede modificarse adicionalmente de forma química o enzimática (por ejemplo, alfa amidación, escisión).

5 En un aspecto, se produce el péptido insulínico GlyExendina-4. La GlyExendina-4 en *Pichia pastoris* implica preparar la construcción de expresión que comprende una secuencia señal, un pro-péptido, un pre-péptido y/o un  
 10 marcador, que se sigue de la secuencia de GlyExendina-4 de 40 aminoácidos en tándem. En ciertas realizaciones, la secuencia señal comprende la secuencia señal de Exendina-4 nativo de 23 aminoácidos o una secuencia señal de factor alfa de 19 aminoácidos. El propéptido comprende el propéptido de GlyExendina-4 nativo de 24  
 15 aminoácidos o un propéptido de 66 aminoácidos del factor alfa. El marcador puede ayudar en el procesamiento del péptido (Kjeldsen *et al.* Biotechnol. Appl. Biochem. 29: 79-86, 1999). En ciertas realizaciones, el marcador es una secuencia de aminoácidos cargada tal como el espaciador EAEA descrito en el Ejemplo 6. Se prepara una secuencia de nucleótidos con codones optimizados para *Pichia* que codifica GlyExendina-4 opcionalmente con un  
 20 péptido señal o propéptido. La secuencia de nucleótidos sintética se clona después en un vector apropiado que porta un gen marcador seleccionable, tal como pPIC, pPIC3K, pPIC9K o pHIL-D. El vector se usa para transformar células de *Pichia pastoris*, y se seleccionan células transformadas que portan el vector. El clon seleccionado se fermenta en una escala suficientemente grande para producir la cantidad deseada de péptido de GlyExendina-4. El péptido de GlyExendina-4 producido de este modo en el caldo no necesita etapas de procesamientos adicionales para hacerlo un péptido completamente funcional a diferencia del producido en el sistema bacteriano (documento EP  
 25 978565 Ohsuye *et al.* Suntory limited). El péptido se purifica del medio usando técnicas de purificación de proteínas conocidas en este campo. El péptido de GlyExendina-4 preferentemente no se glicosila por las células hospedadoras de *Pichia*. La falta de glicosilación también es una ventaja porque la GlyExendina-4 es completamente funcional y conduce a un proceso de purificación más sencillo y más fácil y da como resultado rendimientos mejorados del péptido. El péptido de GlyExendina-4 purificado puede modificarse adicionalmente de  
 30 forma química o enzimática (por ejemplo, alfa amidación C-terminal). El péptido de Exendina-4 puede usarse en composiciones farmacéuticas para administración a un sujeto (por ejemplo, seres humanos).

Se encontró un problema durante la producción del polipéptido de GlyExendina-4 en *Pichia pastoris*. Se descubrió que el polipéptido secretado era una mezcla de molécula de longitud completa y una cortada en el extremo N-  
 35 terminal, sin los dos primeros aminoácidos, HG. La producción de Exendina de longitud completa pudo aumentarse suprimiendo el homólogo de *Pichia pastoris* del gen *STE13* de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica una dipeptidil peptidasa. Este estudio también indicó por primera vez un nuevo sitio de reconocimiento para el homólogo de *Pichia* de *STE13*; también escinde después de la secuencia dipeptídica N-terminal "HG".

### 35 Definiciones

"Péptido" o "proteína". De acuerdo con la presente invención, un "péptido" o una "proteína" comprende una serie de al menos tres aminoácidos ligados entre sí por enlaces peptídicos. Los términos "proteína" y "péptido" pueden usarse de forma intercambiable. Los péptidos de la invención preferentemente contienen solamente aminoácidos  
 40 naturales, aunque pueden emplearse como alternativa aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no aparecen en la naturaleza pero que pueden incorporarse en una cadena polipeptídica) y/o análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica. Además, puede modificarse uno o más de los aminoácidos en un péptido de la invención, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso, un enlazador para conjugación,  
 45 funcionalización u otro modificación (por ejemplo, amidación alfa), etc. En una realización preferida, las modificaciones de péptido conducen a un péptido más estable (por ejemplo, mayor semivida *in vivo*). Estas modificaciones pueden incluir ciclación del péptido, la incorporación de aminoácidos D, etc. Ninguna de las modificaciones debería interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido. En ciertas realizaciones, las modificaciones de péptido conducen a un péptido biológicamente más activo.

"Transformación": El término "transformación" como se usa en este documento se refiere a introducir un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora. El vector puede integrarse a sí mismo o una parte de sí mismo en el cromosoma de las células, o el vector puede existir como un vector extracromosómico  
 50 autoreplicante. Se considera que la integración en algunas realizaciones es ventajosa porque es más probable que el ácido nucleico se mantenga de forma estable en la célula hospedadora. En otras realizaciones, se desea un vector extracromosómico porque cada célula hospedadora puede contener múltiples copias del vector.

La presente invención proporciona un sistema para producir de forma recombinante péptidos insulínicos y es particularmente útil para preparar grandes cantidades de péptidos biológicamente activos para su uso en  
 60 composiciones farmacéuticas o para fines de investigación. La invención proporciona métodos para preparar el polinucleótido y células recombinantes para producir el péptido así como método para producir de forma recombinante el péptido en sí mismo. La invención también incluye secuencias polinucleotídicas, vectores y células útiles en la práctica de los métodos de la invención, y composiciones y métodos farmacéuticos para usar los péptidos producidos de forma recombinante.

65

Como se ha descrito anteriormente, la expresión recombinante de un péptido insulínico en un microorganismo hospedador implica preparar un polinucleótido con la secuencia que codifica el péptido, introducir esta secuencia en un vector, transformar células del microorganismo con el vector y seleccionar células con el vector. Estas células seleccionadas se cultivan después en condiciones adecuadas para producir el péptido insulínico, que se purifica de las células o del medio en el que se cultivan las células. El péptido purificado se usa después en composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades tales como diabetes u obesidad.

Después de que el péptido se haya recogido de la fermentación, el péptido se purifica. El péptido puede purificarse de las células o, si el péptido se secreta, el péptido puede purificarse del medio. Si el péptido se purifica de las células, las células se lisan y el péptido se purifica del lisado celular. El péptido puede purificarse usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad), FPLC, HPLC (por ejemplo, fase inversa, fase normal), etc. El péptido se purifica al nivel de pureza deseado. En ciertas realizaciones, el péptido final es más del 90% puro, 95% puro, 98% puro o 99% puro, preferentemente más del 98% puro.

El péptido purificado puede usarse tal cual, o el péptido puede modificarse adicionalmente. En ciertas realizaciones, el péptido se trata con una proteasa para escindir el péptido. En otras realizaciones, el péptido está fosforilado. En otras realizaciones más, el péptido está glicosilado. El péptido puede estar alfa-amidado. Pueden realizarse otras modificaciones en el péptido. El péptido puede modificarse química o enzimáticamente.

#### *Producción de GlyExendina-4 en Pichia pastoris*

La producción de GlyExendina-4 recombinante en *Pichia pastoris* implica preparar la construcción de expresión que comprende una secuencia señal, un propéptido opcional o un marcador que se sigue de la secuencia de GlyExendina-4 de 40 aminoácidos en tándem. La secuencia señal comprende la secuencia señal de Exendina-4 nativa de 23 aminoácidos o la secuencia señal de factor alfa de 19 aminoácidos. El propéptido comprende propéptido de Exendina-4 nativo de 24 aminoácidos o un propéptido de 66 aminoácidos de factor alfa.

Se obtiene por ingeniería genética una secuencia codificante (CDS) sintética de GlyExendina-4 con codones optimizados para *Pichia*, y se preparan oligonucleótidos solapantes de la secuencia. Los oligonucleótidos se fosforilan, hibridan y ligan. Se realiza una PCR para amplificar la CDS, que se clona en los sitios de restricción de un vector apropiado que porta un gen marcador seleccionable. El vector se selecciona de pPIC, pPIC3K, pPIC9K o pHIL-D. Estos vectores incluyen el promotor AOX para dirigir la expresión del gen de GlyExendina-4. El vector que porta el ADNc de GlyExendina-4 sintético se usa para transformar células de *Pichia pastoris*, y las células transformadas se siembran en medio mínimo.

Las células de *Pichia* transformadas se siembran en medio que contiene un agente de selección para identificar integrantes de múltiples copias y se seleccionan los clones positivos. Se realiza fermentación con los clones positivos y el péptido de GlyExendina-4 se purifica de sobrenadante sin células de *Pichia* usando una combinación de técnicas cromatográficas que incluyen intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, de filtración en gel y/o afinidad. En ciertas realizaciones, el péptido de GlyExendina-4 producido por las células de *Pichia* es un producto completamente no glicosilado.

Se observó durante la expresión de GlyExendina-4 que algunos productos de su degradación aparecían como impurezas. Se determinó por análisis de espectrometría de masas que estas impurezas era formas de GlyExendina-4 cortadas en el extremo N-terminal en 2, 6 u 8 aminoácidos. La proporción de (N-2) GlyExendina-4 y GlyExendina-4 de longitud completa fue de aproximadamente 1:1. Las otras formas se encontraron en cantidades muchos menores y se acumularon a medida que avanzó la fermentación. Este problema se resolvió por alteración del gen que codifica el homólogo de *STE13* de *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia*.

#### *Purificación y Modificación de GlyExendina-4*

El péptido o conjugado peptídico recombinante que tiene la secuencia polipeptídica de GlyExendina-4 se aísla y purifica del medio de cultivo separando el medio de las células hospedadoras, o si el péptido se produce en la célula, separando los residuos celulares después de la lisis celular. El péptido se precipita después usando sal o disolvente y se somete a una diversidad de procedimientos cromatográficos como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad y/o cristalización.

El péptido de GlyExendina-4 tiene 40 aminoácidos. Opcionalmente, el 39º aminoácido, serina, está amidado. El péptido de 40 aminoácidos se amida *in vitro* para producir un péptido de GlyExendina-4 de 39 aminoácidos con el aminoácido C-terminal amidado, es decir se retira la glicina C terminal y se amida la penúltima serina. En ciertas realizaciones, la amidación se consigue usando una enzima alfa amidante C-terminal.

La actividad biológica de GlyExendina-4 y la versión amidada de 39 aminoácidos se determina por su capacidad para inducir la secreción de insulina en una línea celular de insulinoma de rata.

La tecnología de la presente solicitud se elaboró adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### 5 **Ejemplo 1: Síntesis de CDS de GlyExendina con codones optimizados**

Se sintetizó una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codificaba GlyExendina-4 (Secuencia ID N°: 5) por reacción en cadena la polimerasa (PCR) usando oligonucleótidos solapantes. Se sintetizaron diez oligonucleótidos para abarcar el gen de GlyExendina-4 a lo largo de ambas cadenas que tenían una región solapante de 14 pb con los cebadores sucesivos. Los oligonucleótidos solapantes se fosforilaron en una mezcla de reacción que contenía tampón PNK 10x, polinucleótido quinasa T4 y dATP. Se hibridaron cantidades equimolares de oligonucleótidos fosforilados y después se ligaron usando ADN ligasa T4.

La mezcla de ligación se usó como un molde para amplificación de la CDS de GlyExendina-4 por RCR usando los oligonucleótidos 5' CTC GAG AAA AGA CAT GGA GAA GGA ACA TTT ACA TC-3' (Secuencia ID N°: 6) (cebador directo) y 5'-GAA TTC TTA TCC AGA TGG TGG-3' (Secuencia ID N°: 7) (cebador inverso). La reacción de PCR se realizó de acuerdo con protocolos convencionales, y se realizó amplificación en un volumen final de 50 µl usando Turbo polimerasa Pfu (Stratagene). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94 °C durante un ciclo, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; hibridación a 60 °C durante 30 segundos; extensión a 72 °C durante 60 segundos) y una extensión final durante 10 minutos para un ciclo en un Termociclador Perkin-Elmer.

#### **Ejemplo 2: Clonación de CDS de GlyExendina con codones optimizados en vector de secuenciación.**

El fragmento de PCR de 140 pb obtenido después de amplificación se clonó en el vector pTZ57RT/A usando un kit de clonación TA (Fermentas), en una mezcla de reacción que contiene 3 µl del vector, 2 µl de tampón de PCR PEG4000 y un 1 µl de ADN ligasa T4. Se transformaron células competentes DH5α y se exploraron clones positivos que contenían el fragmento del gen de GlyExendina-4 mediante digestión de restricción. Uno de los clones positivos se secuenció en ambas hebras.

#### **Ejemplo 3: Subclonación de CDS de GlyExendina en un vector de expresión**

El fragmento de GlyExendina-4 del clon TA (véase Ejemplo 2) se escindió usando *EcoRI* y *XhoI* y se subclonó en los mismos sitios del vector de expresión de *Pichia pastoris* pPIC9K (Invitrogen, San Diego, CA). Esto situó la secuencia de nucleótidos de GlyExendina-4 en fase con el péptido señal de Mat alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y bajo el control del promotor de alcohol oxidasa (*AOX1*) inducible por metanol (Figura 1). El vector de expresión se usó para transformar *Pichia pastoris* por electroporación como se describe en el manual de Invitrogen.

#### **Ejemplo 4: Expresión de GlyExendina-4 en hospedador de *Pichia pastoris***

##### *Transformación*

El plásmido de expresión que tiene el inserto de nucleótidos con codones optimizados para *Pichia* se introdujo en la cepa GS 115 de *Pichia pastoris* (*his4*, Mut<sup>+</sup>) por electroporación como se describe en el manual de Invitrogen. Las condiciones usadas para electroporación fueron tensión de carga de 1,5 kV, capacitancia de 25 µF y resistencia de 200 Ω. Las células transformadas se sembraron en placas con medio mínimo (YNDB) sin histidina y se incubaron a 30 °C durante 3 días.

##### *Exploración con respecto a integrantes de múltiples copias*

Se seleccionaron colonias individuales de transformantes y se cultivaron en placas de microtitulación que contenían YPD (extracto de levadura 1%, Bacto-Peptona 2%, dextrosa 2%) a 30 °C durante una noche. Los cultivos pre-cultivados se sembraron en réplicas en placas de agar YPD con Geneticina (2 mg/ml) y se incubaron a 30 °C. Los clones que crecían en la placa de YPD-Geneticina (2 mg/ml) se seleccionaron para llevar a cabo estudios de expresión.

##### *Inducción a pequeña escala de GlyExendina-4*

Se indujo expresión de GlyExendina-4 usando el siguiente protocolo:

Inocular cultivo que ha crecido en placas de agar (YEPD) en medio YNBG (Glicerol de Base de Nitrógeno de Levadura) – 50 ml en matraz de 250 ml.

##### Composición de YNBG (para 100 ml)

Base de Nitrógeno de Levadura (YNB) sin aminoácidos: 1,34 g en 90 ml

Glicerol: 20% 10 ml

- 5 Cultivo durante una noche en medio YNBG. Transferencia a BYYG (50 ml en 250 ml) de modo que la DO de partida sea 0,3.

Composición de BYYG (para 100 ml)

10	Bactopeptona	: 1 g
	Extracto de levadura	: 2 g
	YNB sin aa	: 1,34 g
	Glicerol	: 20% 10 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M, pH 6	: 10 ml

- 15 Cultivar durante 2 días. Centrifugar, pesar el sedimento y resuspender en medio de inducción (BYYM) 3 g de sedimento en 6 ml de medio y transferir a matraz de 100 ml.

Composición del medio de inducción (para 100 ml)

20	Bactopeptona	: 1 g
	Extracto de levadura	: 2 g
	YNB sin aa	: 1,34 g
	Metanol	: 3 ml
25	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M, pH 6	: 10 ml

Introducir metanol y nitrógeno cada día (durante 2 días consecutivos) y recoger el tercer día.

- 30 Nitrógeno: 120 µl de 5X YP (0,1X YP)  
Metanol: 180 µl de metanol 100% (3%)

Composición de 5X YP (para 50 ml)

- 35 Extracto de levadura: 2,5 g  
Bactopeptona: 5 g

- 40 Las células inducidas se sedimentaron por centrifugación y el sobrenadante sin células se analizó con respecto a GlyExendina-4 por electroforesis en gel de tricina y HPLC. Aunque se observó una única banda del tamaño esperado en el gel, pudieron observarse dos picos de GlyExendina-4 con HPLC (Figura 2). Estos dos picos se analizaron por análisis de masas y se descubrió que correspondían a las formas de longitud completa y corte N terminal (con los aminoácidos N-terminales HG ausentes; (N-2)) de GlyExendina-4.

**Ejemplo 5: Clonación de GlyExendina-4 en *Pichia pastoris* usando un secuencia espaciadora**

- 45 La secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica GlyExendina-4 se clona en tándem con una secuencia espaciadora que codifica EAEA en su extremo N-terminal en un vector de *Pichia pastoris* pPIC9K. El vector de expresión que portaba el inserto se usó para transformar *Pichia pastoris*. Tras la expresión del polipéptido se escinde el Mat-α que termina con Lys-Arg del péptido mediante la acción de proteasa KEX2 mientras que el péptido espaciador se escinde por una proteasa STE13 permitiendo la liberación de GlyExendina-4. El análisis de  
50 GlyExendina-4 expresada usando esta construcción no ayudó a eliminar o reducir la proporción de (N-2) GlyExendina-4.

**Ejemplo 6: Alteración del homólogo de *Pichia* del gen *STE13* de *Saccharomyces cerevisiae* en clon de *Pichia pastoris* que produce GlyExendina-4**

- 55 La retirada de dos aminoácidos del extremo N-terminal de GlyExendina-4 sugirió la actividad de una dipeptidil peptidasa. Se llevaron a cabo homólogos de *Pichia* de dos dipeptidil peptidasas *DAP2* y *STE13* en un intento de eliminar la impureza de (N-2).

- 60 El homólogo del gen de dipeptidil peptidasa (*STE13*) de *Saccharomyces cerevisiae*, se alteró en *Pichia pastoris* por inactivación de inserción. Se identificó un homólogo de *Pichia pastoris* potencial del gen *STE13* (que codifica una dipeptidil peptidasa de trans-golgi) de *Saccharomyces cerevisiae* usando BLASTP. El Prof. James Cregg proporcionó la secuencia de nucleótidos de *STE13* de *Pichia*. Se seleccionó una región de ~450 pb que se esperaba que alterara el dominio catalítico de la enzima y se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa de  
65 *Pichia pastoris* GS115. El fragmento se clonó después en un vector adecuado, se linealizó dentro de la región de homología y se transformó en la cepa de *Pichia* que produce GlyExendina-4 para conseguir alteración. Se realizó

selección en placas de sorbitol YEPD/IM que contenían Zeocina 100 µg/ml. Se inocularon aproximadamente 900 de estos transformantes en YEPD en placas de 96 pocillos. Después de cultivo de una noche éstos se replicaron en placas de YEPD y se exploraron con respecto a la ausencia de *STE13* por medio de un ensayo de placas. Se exploraron alteraciones potenciales identificadas por el ensayo mediante PCR para comprobar si el locus estaba alterado. El clon que se confirmó que tenía el locus *STE13* alterado se tomó para análisis adicional.

#### Construcción de vector de alteración de *STE13*

La secuencia codificante de CDS de *STE13* y el fragmento seleccionado para proporcionar la homología para dirección se han proporcionado en la Secuencia ID N° 8: El fragmento de *STE13* se ensambló en dos etapas de PCR (Figura 3). La primera etapa de PCR se realizó con Taq polimerasa (Bangalore Genei, India) usando los siguientes pares de cebadores: IISTEFP1/IISTERP1 (PCR1; Secuencia ID N°: 9, 10) e IISTEFP2/IISTERP2 (PCR2; Secuencia ID N°: 11, 12). Parámetros de ciclación en PCR: Desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s; la extensión final se realizó a 72 °C durante 10 min. Se usó el ADN genómico de GS115 como el molde para esta PCR. Los cebadores incorporaron un sitio de restricción (*NdeI*) aproximadamente en el centro del fragmento. Esto proporcionó un sitio de restricción para linealizar la construcción dentro la región homóloga. La segunda etapa de PCR fue una PCR solapante realizada usando XT Taq polimerasa (Bangalore Genei, India) con los dos fragmentos amplificados como molde para generar el fragmento de 450 pb. Cebadores usados para PCR solapante: IISTEFP1/IISTERP2. Parámetros de ciclación de PCR: Igual que PCR1, pero modificados para incluir 3 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación a 37 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 30 s, después de la etapa de desnaturalización inicial para facilitar el solapamiento. También se introdujeron sitios de restricción en los extremos 5' y 3' de los fragmentos para facilitar la clonación. El fragmento de 450 pb se clonó en primer lugar en el vector pTZ57R-TA (Fermentas, Canadá) y su identidad se confirmó por secuenciación. Se subclonó después en pPICZA (Invitrogen, Estados Unidos) en los sitios *BamHI/BglII* para obtener Stefrg/pPICZA (Figura 4). Después de linealización de Stefrg/pPICZA por *NdeI*, la construcción se usó para transformar la cepa de *Pichia pastoris* que produce GlyExendina-4 por electroporación (Método descrito anteriormente en el Ejemplo 4).

#### Ensayo de Placas

El ensayo se ha descrito previamente para *Saccharomyces cerevisiae* (Rendueles y Wolf, (1987) J. Bacteriol., 169(9): 4041-4048). Brevemente, las colonias se lisaron primero inundando las placas con cloroformo. Después de que el cloroformo se hubo evaporado completamente, se vertió una mezcla del sustrato, Ala-Pro-4MβNA y Fast garnet GBC en agar Tris 1% para formar una capa. Esta se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 10-15 minutos. Las colonias que no se teñían de rojo se seleccionaron como alteradas para *STE13*. Se incluyó GS115 con *STE13* intacto como un control para comprobar el progreso de la tinción.

#### Análisis de PCR

Se aisló ADN genómico de los transformantes que se seleccionaron como positivos en el ensayo de placas y la alteración del locus *STE13* se confirmó por PCR. Se diseñó un cebador directo cadena arriba de la región de homología y un cebador inverso de la secuencia del vector de modo que se observara una amplificación de ~800 pb en la alterada. El locus no alterado no debería mostrar ninguna amplificación. De los positivos obtenidos por análisis de PCR (Figura 5), el clon D2 se tomó para análisis adicional.

El clon D2 se indujo con metanol (Método como se ha descrito en el Ejemplo 4) y la GlyExendina-4 expresada cuando se comprobó por HPLC y LCMS no estaba cortada en el extremo N-terminal. Esto mostró claramente que la actividad dipeptidil peptidasa de *STE13* era responsable del corte N-terminal de GlyExendina-4 (Figura 6).

Se llevó a cabo alteración del homólogo de *Pichia* del gen de dipeptidil peptidasa de *Saccharomyces cerevisiae* *DAP2* en el clon de *Pichia* que expresaba GlyExendina-4 de una manera similar (datos no mostrados). Este continuó mostrando impureza de (N-2) lo que indica que no era responsable de la generación de esta impureza (véase Figura 7).

#### 55 Ejemplo 7: Fermentación de *Pichia pastoris* para expresión de GlyExendina-4

Se inocularon células de *Pichia* recién descongeladas de un vial almacenado a -70 °C en 50 ml de medio de cultivo (extracto de levadura 1%, peptona 2%, tampón de fosfato 1M 10% de pH 6,0, base de nitrógeno de levadura 0,67% y glicerol 0,1%) y se cultivó a 28-32 °C y 220-260 rpm. Las células sembradas se cultivan en un fermentador de 2 l que contiene un litro de medio de fermentación consistente en glicerol 4%, sulfato cálcico 0,01%, sulfato potásico 2%, sulfato magnésico 1,4% e hidróxido potásico 0,4%. Se realizaron experimentos de fermentador con el medio anterior a diferentes temperaturas que variaban de 20 °C a 30 °C, pH 5,0, tasa de aireación 0,5-2,0 vvm. La velocidad de agitación se aumentó gradualmente de 350 a 1200 rpm para mantener el nivel de oxígeno disuelto por encima del 30%. La biomasa se acumuló hasta 300 g/l por introducción de glicerol al 50%. De forma aséptica se recogió 1 l de caldo de cultivo y se repartieron 50 ml de caldo de cultivo en cada uno de doce matraces de 250 ml. Todos los matraces se incubaron a diferentes temperaturas que variaban de 20 °C a 30 °C de 220 a 260 rpm. Se

añadieron 100 µl de metanol cada día y después de cinco días se realizó análisis con respecto a expresión de GlyExendina-4.

- 5 Se tomaron muestras cada 24 horas después de la introducción de metanol y se determinaron los niveles de GlyExendina-4 usando HPLC. A continuación se proporcionan las producciones de GlyExendina-4 obtenidas después de 5 días de fermentación a diferentes temperaturas de cultivo.

**Tabla 1**

Temperatura de cultivo (°C)	Producción de GlyExendina-4 (g/l)
20	0,0443
22	0,0467
24	0,0567
26	0,0867
28	0,0905
30	0,0685

10 **Ejemplo 8: Fermentación de *Pichia* recombinante para producción de GlyExendina-4**

- Se inocularon células *Pichia* recién descongeladas de un vial almacenado a -70 °C en 50 ml de medio de cultivo (extracto de levadura 1%, peptona 2%, tampón fosfato 1 M (pH 6,0) 10%, base de nitrógeno de levadura 0,67% y glicerol 0,1%) a 28-32 °C y 220-260 rpm. Las células sembradas se cultivan en un fermentador de 2 l que contiene un litro de medio de fermentación (glicerol 3,5%, sulfato cálcico 0,01%, sulfato potásico 1%, sulfato magnésico 1%, hidróxido potásico 0,25%). Se realizaron experimentos de fermentador con el medio anterior a diferentes temperaturas que variaban de 20 °C a 30 °C, pH 5,0, tasa de aireación 0,5-2,0 vvm. La velocidad de agitación se aumentó gradualmente de 350 a 1200 rpm para mantener el nivel de oxígeno disuelto por encima del 30%. La biomasa se acumuló hasta 285 g/l por introducción de glicerol al 50%, y después se llevó a cabo introducción de metanol.

- Se tomaron muestras cada 24 horas después de la introducción de metanol y se determinaron los niveles de GlyExendina-4 usando HPLC. Se proporcionan a continuación las producciones de GlyExendina-4 después de 5 días de fermentación a diferentes temperaturas de crecimiento.

25

**Tabla 2**

Temperatura de cultivo (°C)	Producción de GlyExendina-4 (g/l)
20	0,23
22	0,37
24	0,67
26	0,72
28	0,75
30	0,67

**Ejemplo 9: Caracterización de GlyExendina-4 expresada en *Pichia***

- 30 Se purificó GlyExendina-4 del sobrenadante sin células después de la fermentación usando técnicas cromatográficas convencionales. El péptido purificado tuvo una masa de 4,2 kDa como se caracterizó por ESI-TOF (Figura 8) que se corresponde con GlyExendina-3 de longitud completa, lo que indica fuertemente la ausencia de especies glicosiladas y cortadas en el extremo N-terminal. La secuenciación N-terminal (Secuencia ID N°: 13) confirmó adicionalmente la ausencia de degradación N-terminal. La secuencia del péptido expresado se confirmó por digestión triptica (Figura 9) seguido de secuenciación de los fragmentos individuales (Secuencias ID N°: 14-17). Esto confirmó adicionalmente la ausencia de especies glicosiladas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110>XXX  
<120> Producción de péptidos insulíntrópicos  
<130> 2001568-0040  
45 <140> Aún no asignado  
<141> 11-11-1950  
<160> 13  
50 <170> PatentIn versión 3.2

5 <210> 1  
 <211>87  
 <212> PRT  
 <213> *Heloderma suspectum*  
 <223> Secuencia de aminoácidos del precursor de Exendina-4  
 <400> 1

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

15 <210>2  
 <211>39  
 <212> PRT  
 <213> *Heloderma suspectum*  
 <223> Secuencia de aminoácidos de Exendina-4  
 <400> 2

20  
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser -NH<sub>2</sub>  
 35

25 <210>3  
 <211>31  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 401 856 T3

<223> Secuencia de aminoácidos de GLP-1 activo (7-37)

<400> 3

**His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly**  
1 5 10 15

**Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly**  
20 25 30

5

<210>4

<211> 40

<212> PRT

10

<213> *Heloderma suspectum*

<223> Secuencia de aminoácidos de GlyExendina-4

<400> 4

15

**His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu**  
1 5 10 15

**Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser**  
20 25 30

**Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly**  
35 40

20

<210>5

<211> 141

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25

<223> Secuencia de nucleótido que codifica Exendina - 4, optimizada para la expresión en *Pichia pastoris*.

<400> 5

**ctcgagaaaa gacatggaga aggaacattt acatctgatt tgcctaaaca aatggaagaa 60**

**gaagctgtta gattgtttat tgaatggttg aaaaacggag gaccatcttc tggagctcca 120**

**ccaccatctg gataagaatt c 141**

30

<210>6

<211>35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35

<223> Cebador de PCR (directo) para la amplificación de CDS de Exendina-4

<400> 6

ctcgagaaaa gacatggaga aggaacattt acatc 35

## ES 2 401 856 T3

5 <210>7  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador de PCR (inverso) para la amplificación de CDS de Exendina-4

10 <400> 7  
gaattcttat ccagatggtg g 21

15 <210>8  
<211> 2553  
<212> ADN  
<213> *Pichia pastoris*

<223> Secuencia de nucleótidos de CDS de *STE13*. La secuencia de dirección se indica en negrita.

20 <400> 8

ATGACATCTCGGACAGCTGAGAACCCGTTTCGATATAGAGCTTCAAGAGAATCTAAGTCCACGTTCTTCCA  
 ATTCGTCCATATTTGGAAAACATTAATGAGTATGCTAGAAGACATCGCAATGATTCGCTTTCCCAAGAATG  
 TGATAATGAAGATGAGAACGAAAATCTCAATTATACTGATAACTTGGCCAAGTTTTCAAAGTCTGGAGTA  
 TCAAGAAAGAGCTGTATGCTAATATTTGGTATTTGCTTTGTTATCTGGCTGTTTCTCTTTGCCTTGATG  
 CGAGGGACAATCGATTTTCCAATTTGAACGAGTACGTTCCAGATTCAAACAGCCACGGAACGCTTCTGC  
 CACCACGTTATCGTTGAACCAAAACAGACTGAATTACCTGAAAGCAAAGATTC AACACTGATTATCAA  
 AAAGGAGCTAAATGAGCCTTAGCGGCTGGAGATCAGGTCTGTACAATGTCTATCCAAAACGATCTCTC  
 GTGGTGAAGATGACATATACTATGAACACAGTTTTTCATCGTATAGATGAAAAGAGGATTACAGACTCTCA  
 ACACGGTTCGAACTGATTTAACTATGAGAAAATGAAGTAAATGGAATCACGTATACAGTGTCAATTTGTC  
 ACCATTTCTCCTTACGATTTGCCCCAATTTCTTAGTCGCATGCGACTATGAAAACACTGGAGACATTTCTA  
 CGTTTGCAAAATATTTTCATATATGATAAGGAAAGCGACCAAGAGGATAGCTTTGTACCTGTCTACGATGA  
 CAAGGCATTGAGCTTCGTTGAATGGTCGCCCCAGGTGATCATGTAGTATTCGTTTTTGAAAACAATGTA  
 TACCTCAAACAACCTCTCAACTTTAGAGGTTAAGCAGGTAACTTTTGATGGTGATGAGAGTATTACAATG  
 GTAAGCCTGACTGGATCTATGAAGAGGAAGTTTTAAGTAGCGACAGAGCCATATGGTGGAAATGACGATGG  
 ATCGTACTTTACGTTCTTGAGACTTGATGACAGCAATGTCCCAACCTTCAACTTGCAGCATTFTTTTTGAA  
 GAAACAGGCTCTGTGTCGAAATATCCGGTCATTGATCGATTGAAATATCCAAAACCAGGATTTGACAACC  
 CCCTGGTTTCTTTGTTTAGTTACAACGTTGCCAAGCAAAAGTTAGAAAAGCTAAATATTGGAGCAGCAGT  
 TTCTTTGGGAGAAGACTTCGTGCTTTACAGTTAAAATGGATAGACAATTCTTTTTTCTTGTGCAAGTTC  
 ACAGACCGCACTTCGAAAAAATGGAAGTTACTCTAGTGGACATTGAAGCCAATTCTGCTTCGGTGGTGA  
 GAAAACATGATGCAACTGAGTATAACGGCTGGTTCAGTGGAGAATTTTCGTTTATCCTGTGCTGGAGA  
 TACCATTGGTTACATTGATGTAATCTATTATGAGGACTACGATCACTTGGCTTATTATCCAGACTGACACA  
 TCCGATAAGTATATTGTGCTTACAGATGGTTCATGGAATGTGTGGACCTGGAGTTTTAGAAAGTCTTG  
 AAGATAGAGTCTACTTTATCGGCACCAAGAATCATCAATGGAACATCACTTGTATTATACATCATTAAAC  
 GGGACCCAAGGTTAAGGCTGTTATGGATATCAAAGAACCCTGGGTACTTTGATGTAAACATTAAGGGAAAA  
 TATGCTTTACTATCTTACAGAGGCCCAACTCCCATACCAGAAATTTATTGATCTTTCGACCCCTAGTA  
 CAACAAGTCTTGATGACATTTTATCGTCTAATAGAGGAATGTGCGAGGACGGCGTCACACTGAACATGAT  
 TGAAGTGTTCCTGCCAATTTAATCCTAGCAAGAAGTACCCACTGTTGGTCAACATTTATGGTGGACCG  
 GGCTCCCAGAAGTTAGATGTGCAGTTCAACATTTGGGTTTGAGCATATTATTTCTTCGTCACCTGGATGCAA  
 TAGTGTCTTACATAGATCCGAGAGGTACTGAGAGGTAAGCTGGGCTTTTAAATCTTACGCTACAGAGAA  
 AATAGGCTACTGGGAACCACGAGACATCACTGCAGTAGTTTCCAAGTGGATTTACAGATCACTCATTGTG  
 AATCCTGACAAAACCTGCGATATGGGGGTGGTCTTACGGTGGGTTCACTACGCTTAAGACATTTGGAATATG  
 ATTCTGGAGAGGTTTTCAAATATGGTATGGCTGTTGCTCCAGTAACATAATTGGCTTTTGTATGACTCCAT  
 CTACACTGAAAGATACATGAACCTTCAAAGGACAATGTTGAAGGCTACAGTGAACACAGCGTCATTAAAG  
 AAGGTTTCCAATTTAAGAATGTAACCGATTCTTTGGTTTGTACAGGACTACTGATGATAACGTGCATT  
 TTCAGAACACACTAACCTTACTGGACCAGTTCAATATTAATGGTGTGTGAATTACGATCTTCAGGTGTA  
 TCCCGACAGTGAACATAGCATTGCCCATACAACGCAAAATAAAGTGATCTACGAGAGGTTATTCAAGTGG

TTAGAGCGGGCATTTAACGATAGATTTTTGTAA

- <210>9
- <211>30
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>

<223> Cebador (directo) para la amplificación de la secuencia de dirección de *STE13* de *Pichia*-PCR1

ES 2 401 856 T3

<400> 9  
ggatccgcag ttcaacattg ggttgagca

5 <210> 10  
<211>28  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador (inverso) para la amplificación de la secuencia de dirección de *STE13* de Pichia-PCR 1

<400> 10  
ccagaatcat atgccaatgt ctaagcg

15 <210> 11  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador (directo) para la amplificación de la secuencia de dirección de *STE13* de Pichia-PCR2

<400> 11  
cgcttaagac atggcatat gattctgg

25 <210> 12  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Cebador (inverso) para la amplificación de la secuencia de dirección de *STE13* de Pichia-PCR2

<400> 12  
agatctgtcc cgtgacaaac caagaatcgg

35 <210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Heloderma suspectum*

40 <223> Resultados de secuenciación N-terminal

<400> 13

45

**His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu**  
**1 5 10**

<210> 14  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Heloderma suspectum*

50 <223> Fragmento obtenido en digestión triptica de GlyExendina-4 - corresponde al pico T1 en la Figura 9

<400> 14

55

**His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys**  
**1 5 10**

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT

60

ES 2 401 856 T3

<213> *Heloderma suspectum*

<223> Fragmento obtenido en digestión triptica de GlyExendina-4 - corresponde al pico T2 en la Figura 9

<400> 15

5

**Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg**  
**1 5**

<210> 16

<211> 7

10

<212> PRT

<213> *Heloderma suspectum*

<223> Fragmento obtenido en digestión triptica de GlyExendina-4 - corresponde al pico T3 en la Figura 9

15

<400> 16

**Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys**  
**1 5**

<210> 17

20

<211> 13

<212> PRT

<213> *Heloderma suspectum*

<223> Fragmento obtenido en digestión triptica de GlyExendina-4 - corresponde al pico T4 en la Figura 9

25

<400> 17

**Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly**  
**1 5 10**

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga un sitio de reconocimiento N-terminal His-Gly con actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de:
- a) transformar una célula hospedadora modificada genéticamente que tiene supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido;
  - b) cultivar la célula hospedadora transformada para producir el polipéptido; y
  - c) alfa-amidar el polipéptido para producir polipéptido biológicamente activo.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora es célula de levadura.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la célula de levadura es *Pichia pastoris*.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen de proteasa es un gen de dipeptidil peptidasa N-terminal.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células transformadas se cultivan en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.
- 25 6. Un método para producir un polipéptido biológicamente activo que tenga un sitio de reconocimiento N-terminal His-Gly con actividad insulínica, comprendiendo el método las etapas de:
- a) transformar una *Pichia pastoris* modificada genéticamente que tiene supresión del gen de proteasa STE13, con un vector polinucleotídico que codifica el polipéptido; y
  - b) cultivar la *Pichia pastoris* transformada para producir el polipéptido biológicamente activo.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polipéptido es GlyExendina-4 de SEC ID N°: 4.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la GlyExendina-4 tiene la secuencia polinucleotídica correspondiente de SEC ID N° 5.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el polipéptido de GlyExendina-4 se pone en contacto con una enzima alfa-amidante C-terminal para producir un polipéptido de exendina-4 alfa-amidado.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polipéptido de exendina-4 alfa-amidado es HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>.

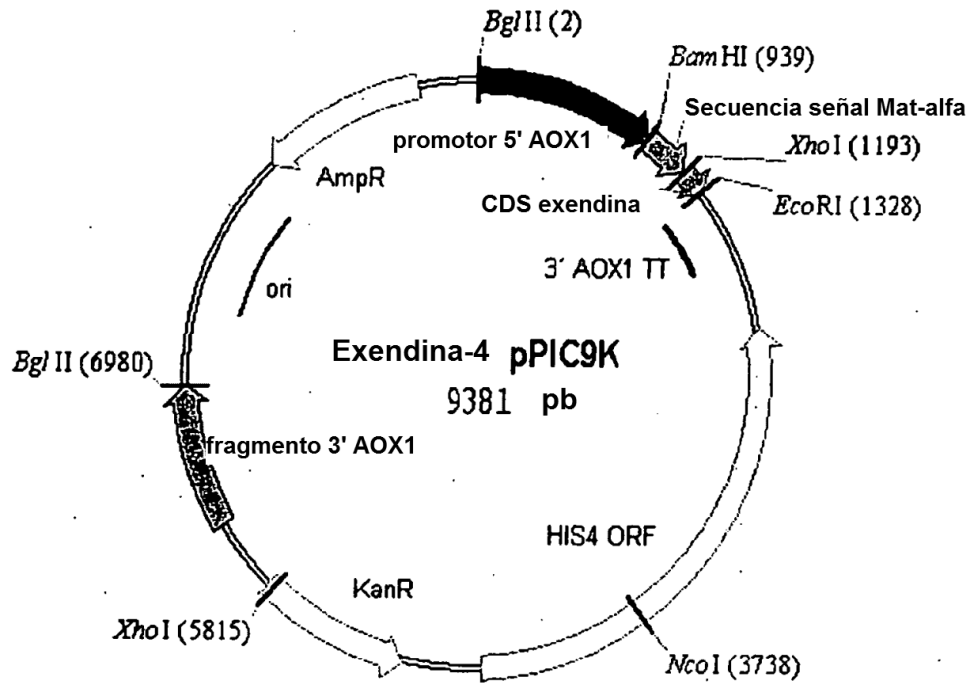


Figura 1

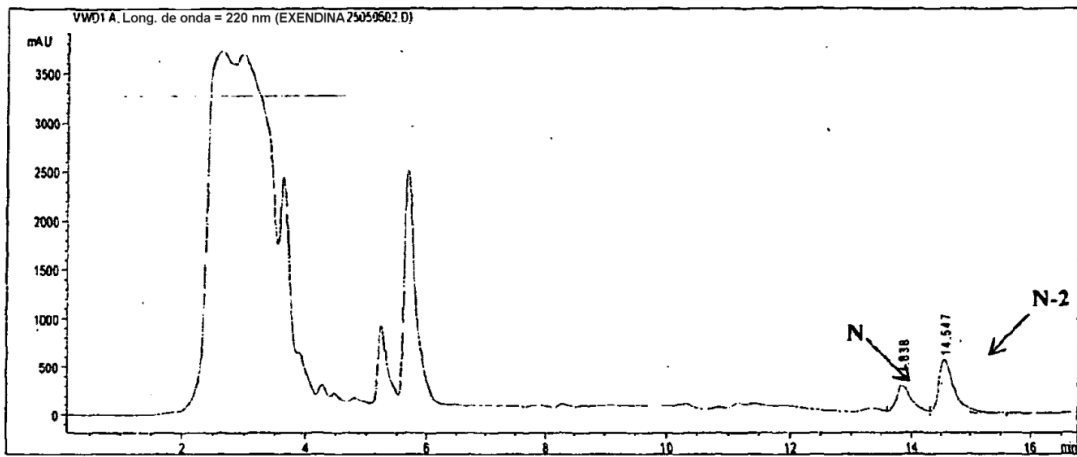


Figura 2

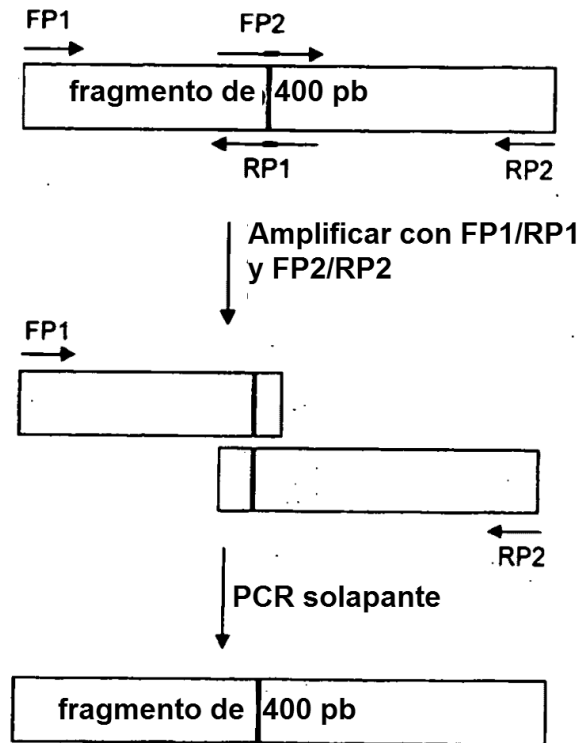


Figura 3

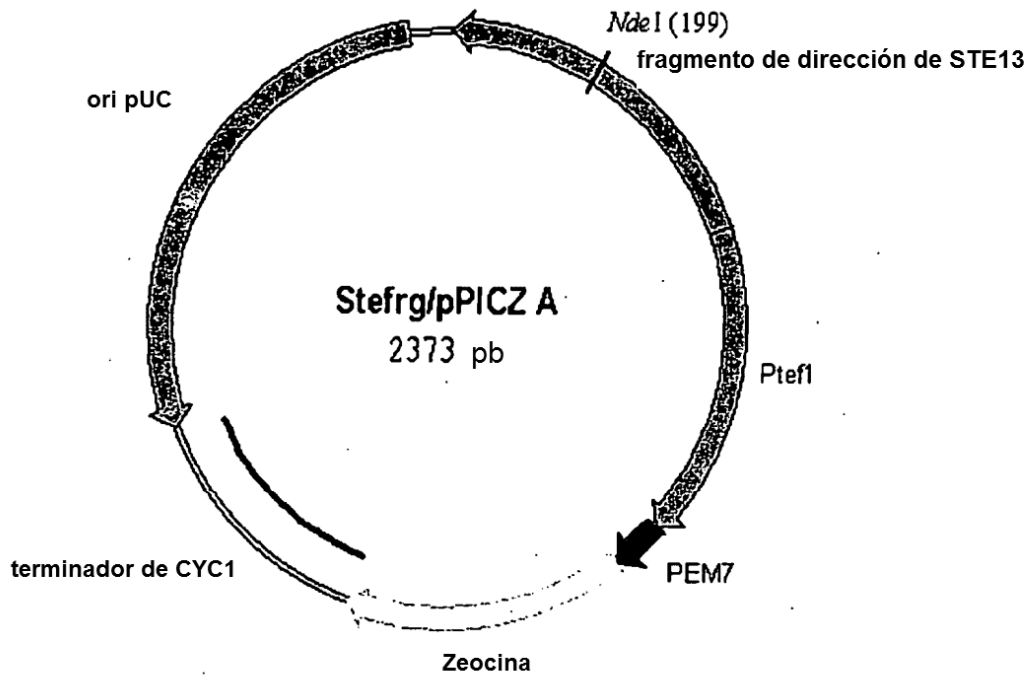


Figura 4

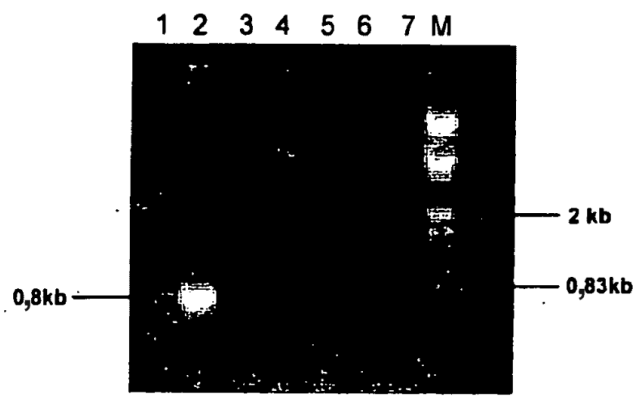


Figura 5

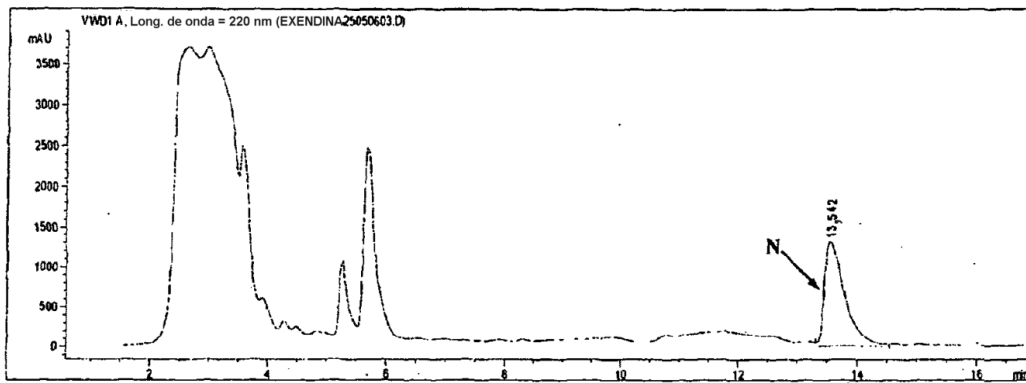


Figura 6

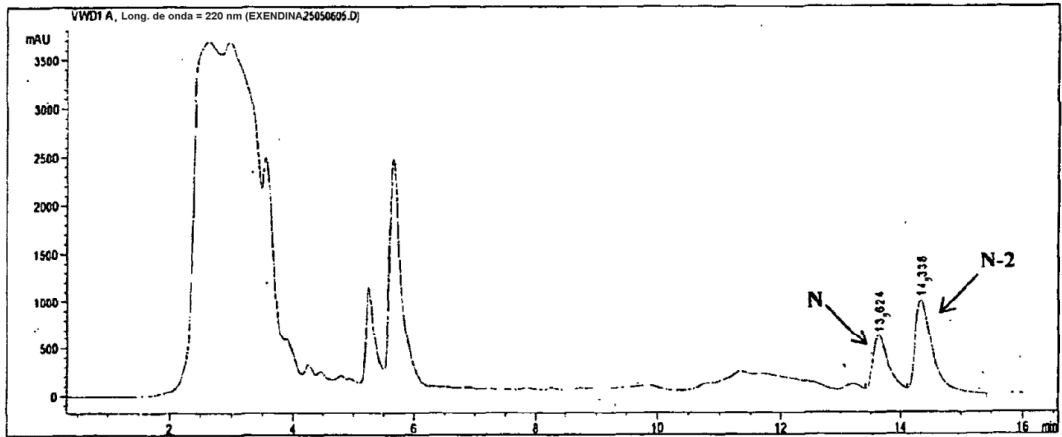


Figura 7

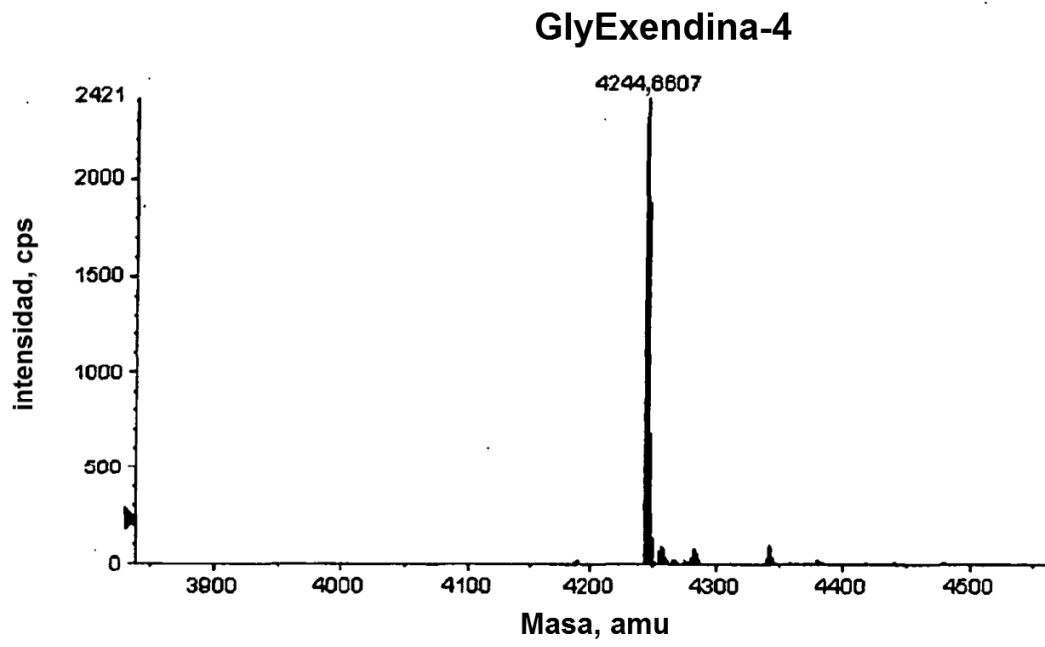


Figura 8

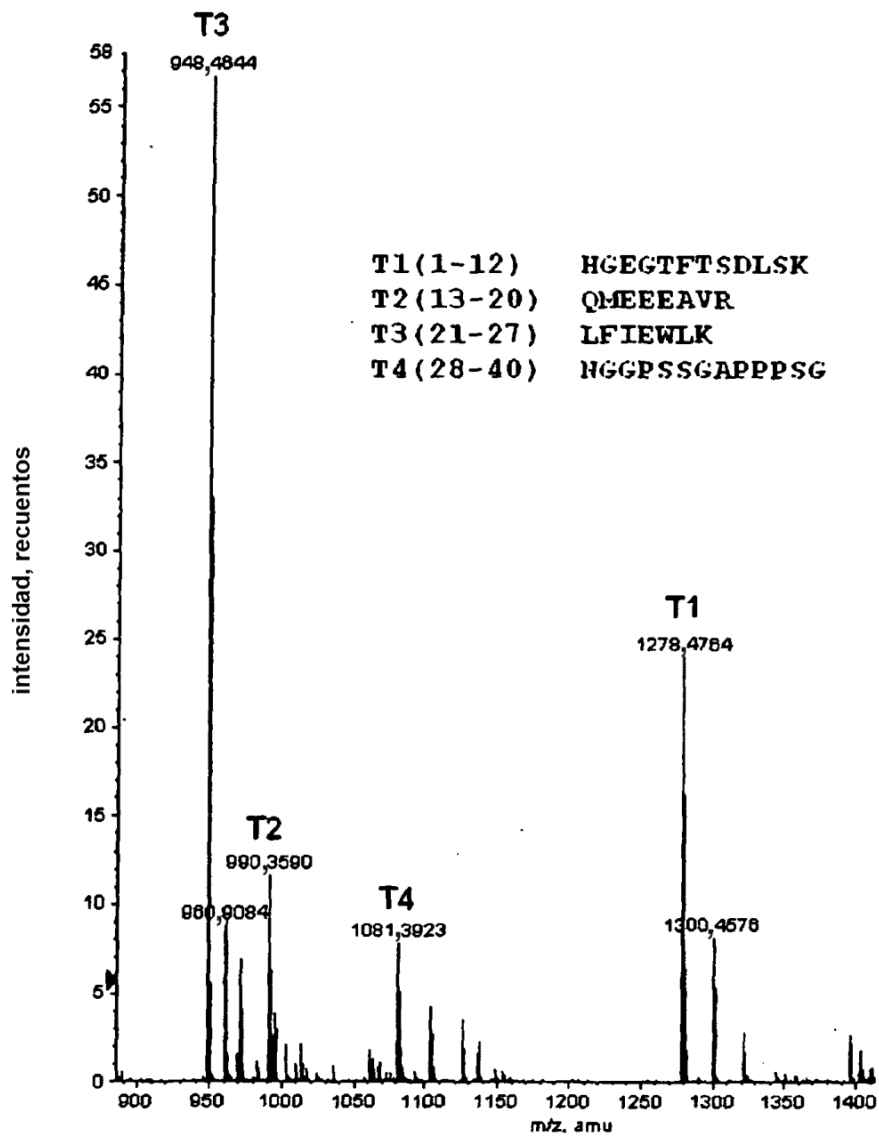


Figura 9