



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 684**

51 Int. Cl.:
C12N 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04028526 .4**

96 Fecha de presentación : **02.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1538203**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Carboxipeptidasa B recombinante y su purificación.**

30 Prioridad: **05.12.2003 EP 03028101**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2010

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Glaser, Stephan;**
Geipel, Frank;
Kirschbaum, Thomas;
Rexer, Bernhard, Dr.;
Thalhofer, Johann-Peter;
Mueller, Rainer;
Giessel, Claudia;
Eckstein, Hellmut y
Wolf, Elvira

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 337 684 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

Carboxipeptidasa B recombinante y su purificación.

5 La presente invención pertenece al campo de la biotecnología. Más específicamente, la invención pertenece a la producción y posterior procesamiento de un precursor enzimáticamente inactivo de una proteína con actividad carboxipeptidasa B. Un aspecto de la invención pertenece a la activación y purificación concomitante de la proteína con actividad carboxipeptidasa B.

10 Las carboxipeptidasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos C-terminal. La familia de la carboxipeptidasa incluye metalo-, serina, y cisteína carboxipeptidasas. De acuerdo con su especificidad de sustrato, estas enzimas se denominan carboxipeptidasa A (escindiendo residuos alifáticos) o carboxipeptidasa B (escindiendo residuos amino básicos). La carboxipeptidasa B (EC 3.4.17.2) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los aminoácidos básicos, Lisina, Arginina, y Ornitina a partir de la posición C-terminal en los polipéptidos:

15
$$\text{Peptidil-L-Lisina(aminoácido -L-básico)} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Péptido} + \text{L-Lisina(aminoácido -L-básico)}$$

20 El precursor de la carboxipeptidasa B es un zimógeno o proenzima en el páncreas de la mayoría de vertebrados (revisado por Folk J. Carboxypeptidase B, en: The Enzymes 3, P. Boyer, Academic Press, NY, 57, 1971). La carboxipeptidasa B puede funcionar en la posterior degradación de productos provenientes de la digestión con tripsina, para los que son muy específicos, como la carboxipeptidasa A es específica para los productos de quimiotripsina. La carboxipeptidasa B también posee una actividad esterasa que está relacionada con el contenido metálico de la enzima (Folk, J., y Gladner, J.: Biochim Biophys Acta (1961) 48, 139-47; Zisapel, N. y Sokolovsky, M, Eur J Biochem (1975) 25 54, 541-7).

Un “zimógeno” o una “proenzima” es el precursor inactivo de una enzima. En otras palabras, un zimógeno o una proenzima es el precursor inactivo de una proteína con actividad enzimática como una proteína con actividad carboxipeptidasa B. Muchas proteínas con actividad enzimática se sintetizan como dichos precursores inactivos y se activan posteriormente mediante escisión de uno a varios enlaces péptidos específicos. La activación de enzimas y otras proteínas mediante proteólisis específica ocurre frecuentemente en los sistemas biológicos. Por ejemplo: (a) La proteína fibrosa de colágeno que está presente en la piel y huesos deriva del procolágeno que es un precursor soluble, (b) Algunas proteínas de hormonas se sintetizan como precursores inactivos. Por ejemplo, la insulina deriva de la proinsulina mediante eliminación proteolítica de un péptido. (c) Las enzimas digestiva que hidrolizan proteínas se sintetizan y secretan como zimógenos en el estómago y el páncreas. La carboxipeptidasa B pertenece a este grupo, (d) La coagulación de la sangre está mediada mediante una cascada de activaciones proteolíticas que aseguran una respuesta rápida y amplificada al trauma.

40 *In vivo* el zimógeno de la carboxipeptidasa B, es decir, la “pro-carboxipeptidasa B”, se traduce en las células pancreáticas como una pre-proteína denominada “pre-pro-carboxipeptidasa B”.

La pre-pro-carboxipeptidasa B comprende en su N-terminal un péptido señal. La secuencia de aminoácidos de la pre-pro-carboxipeptidasa B describe el producto traduccional primario. El péptido señal dirige al polipéptido de la pre-pro-carboxipeptidasa B hacia la ruta de secreción de la célula pancreática. Durante el proceso de secreción el péptido líder se escinde proteolíticamente, convirtiendo así la pre-pro-carboxipeptidasa B en la pro-carboxipeptidasa B.

La pro-carboxipeptidasa B está desprovista de actividad enzimática. La activación *in vivo* normalmente tiene lugar en el intestino delgado. La tripsina rompe la pro-carboxipeptidasa B, generando así un propéptido enzimáticamente inactivo y la enzima carboxipeptidasa B proteolíticamente activa.

50 Como ejemplo para la pre-pro-carboxipeptidasa, el Id. de Sec. N°: 1 describe la secuencia de aminoácidos de la pre-pro-carboxipeptidasa B de rata como se publicó en Clauser E. *et al.*, J. Biol. Chem. 1988, Vol. 263, 17837-45. De acuerdo con esto, los primeros 13 aminoácidos del polipéptido de la pre-pro-carboxipeptidasa B representan el péptido señal y los siguientes 95 aminoácidos constituyen el propéptido. El producto de activación, es decir, la enzima carboxipeptidasa B de rata activa contiene 307 aminoácidos con un peso molecular calculado de 35.228 Da.

60 Al utilizar tripsina, la pro-carboxipeptidasa B puede también activarse *in vitro* para formar la carboxipeptidasa B. La conformación del propéptido y la porción de enzima han demostrado mediante métodos analíticos como las electroforesis en gel de SDS así como HPLC de fase reversa de Ventura *et al.* J. Biol. Chem. (1999) 274(28), 19925-33.

Los experimentos de activación *in vitro* bajo varias condiciones han demostrado que mientras una enzima carboxipeptidasa B proteolíticamente activa se genera fácilmente, bajo condiciones no desnaturizantes, el propéptido permanece unido de forma no covalente a un gran número de moléculas de carboxipeptidasa B. Esto se puede ver cuando las condiciones desnaturizantes se aplican al complejo de propéptido y enzima. Así, los métodos de purificación no desnaturizantes y en particular la cromatografía de intercambio de aniones no proporcionan ni de cerca medios suficientes para separar el propéptido unido de forma no covalente de la enzima carboxipeptidasa B.

ES 2 337 684 T3

Debido a su gran especificidad para los aminoácidos básicos en C-terminal, se ha encontrado un amplio uso para la carboxipeptidasa B, por ejemplo en el análisis de final de grupo para la determinación de secuencias. No obstante, es de mayor importancia económica la aplicación industrial que implica el procesamiento proteolítico. En particular, la carboxipeptidasa B se utiliza en los procesos de producción que conducen a la insulina para su uso médico y que involucran la escisión proteolítica de la pro-insulina.

Respecto a la insulina como producto médico, surge un problema concreto a favor del propéptido de la carboxipeptidasa B que no está covalentemente unido a la enzima carboxipeptidasa B. En dichos procesos de producción de insulina, tras la escisión proteolítica de la pro-insulina, el fragmento de insulina se purifica bajo condiciones desnaturalizantes. Como consecuencia, es posible que el propéptido de la carboxipeptidasa B se copurifique con la insulina. En tal caso, la separación del propéptido de la carboxipeptidasa B de la molécula de insulina puede ser un proceso laborioso que al mismo tiempo disminuya probablemente la proporción final de insulina purificada.

La carboxipeptidasa B purificada disponible comercialmente a partir de páncreas porcino puede que no esté totalmente libre de otras actividades proteolíticas. Además, como es el caso para la mayoría de productos derivados de animales, la carboxipeptidasa B porcina puede contener agentes infecciosos como virus, priones, u otros componentes biológicamente activos con potencial deletéreo para la salud humana. Por lo tanto, es deseable obtener carboxipeptidasa B a partir de una fuente alternativa. Además, es deseable que la carboxipeptidasa B de la fuente alternativa esté sustancialmente libre de propéptido.

Se conoce en la materia que la carboxipeptidasa B puede producirse de forma recombinante en organismos huésped transformados (por ejemplo Ventura *et al.* J. Biol. Chem. (1999) 274(28), 19925-33) y purificarla a partir de ellos.

WO 01/51624 describe la expresión recombinante de pro-carboxipeptidasa B porcina en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Tras la activación del zimógeno a través de la escisión tróptica, un primer paso de purificación incluye la cromatografía hidrofóbica. Tras la adición del inhibidor de la tripsina de semilla de soja, la enzima activada se purifica posteriormente utilizando cromatografía con Q-sepharose. El método de purificación de WO 01/51624 involucra pasos múltiples y existe una pérdida concomitante de producto de carboxipeptidasa B. Además, existe la necesidad de separar el inhibidor de la tripsina de semilla de soja así como el propéptido de la carboxipeptidasa B del producto.

DE 19 915 938 describe la expresión recombinante de una pro-carboxipeptidasa B humana con colas de histidina en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. El producto se purifica utilizando cromatografía de afinidad y mediante la cola de Histidina. Posteriormente, la pro-carboxipeptidasa B se activa utilizando tripsina y la reacción de activación finaliza mediante la adición de inhibidor de tripsina de semilla de soja. Mediante la filtración a través de una membrana que excluye partículas por encima de un peso molecular de alrededor de 30.000 Da, la carboxipeptidasa B se separa de la tripsina, el propéptido, el inhibidor así como otros fragmentos que se generaron durante el curso del proceso de purificación. No obstante, como el peso molecular de la enzima carboxipeptidasa B es de alrededor de 37.000 Da, se esperan pérdidas debido al paso de filtración, dependiendo del tamaño de distribución de los poros en el filtro utilizado. Además, al realizar el paso de activación en el zimógeno disuelto, existe la necesidad de separar además el propéptido de la enzima carboxipeptidasa B.

En WO 96/23064 se describe la expresión recombinante de la pro-carboxipeptidasa B de rata en *E. coli*. Se producen cuerpos de inclusión de pro-carboxipeptidasa B insoluble. El zimógeno se renaturaliza y posteriormente se purifica. El paso de activación se realiza sobre el zimógeno disuelto y existe la necesidad de separar de nuevo el propéptido de la enzima carboxipeptidasa B. Debido a los pasos de desnaturalización/renaturalización, el rendimiento de la enzima carboxipeptidasa B obtenible utilizando este método es comparablemente bajo.

Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, no se conoce un método específico para separar la carboxipeptidasa B activada de la forma no activada.

El problema a resolver mediante la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un método alternativo para producir una proteína con actividad carboxipeptidasa B a partir de un zimógeno, en el que se evita la unión no covalente del propéptido a la proteína con actividad carboxipeptidasa B. Otro problema a resolver mediante la presente invención es proporcionar un método alternativo para separar la proteína con actividad carboxipeptidasa B del propéptido y del zimógeno residual tras el paso de activación. Otro problema a resolver mediante la presente invención es proporcionar un método alternativo para separar bajo condiciones no desnaturalizantes la proteína con actividad carboxipeptidasa B del propéptido y del zimógeno residual, tras el paso de activación.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para producir una proteína con actividad carboxipeptidasa B, que comprende los pasos de a) proporcionar un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en la pro-carboxipeptidasa B de rata que está fusionada en N-terminal a una cola de Histidina y a un péptido señal, en el que opcionalmente entre la cola de histidina y el péptido señal o entre la cola de histidina y la pro-carboxipeptidasa B de rata se inserta una secuencia espaciadora; (b) transformar un organismo huésped microbiano con el vector; (c) cultivar el organismo huésped microbiano en un medio de cultivo que contiene nutrientes y una fuente de carbono, en el que el organismo huésped microbiano expresa la preproteína y secreta la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina en el medio de cultivo; (d) inmovilizar la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada en el medio de cultivo del paso (c) sobre una matriz de afinidad por los quelatos metálicos

particulados capaz de unirse a la cola de histidina, y lavar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, en la que la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina se inmoviliza; (e) incubar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados con la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina inmovilizada del paso (d) en un tampón que contiene tripsina, que escinde así de forma proteolítica la porción de pro-carboxipeptidasa B y liberando la proteína con actividad carboxipeptidasa B en la fase líquida, en la que la porción de propéptido con colas de histidina está inmovilizada; (f) separar la fase líquida que contiene la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, en la que la porción de propéptido con colas de histidina está inmovilizada en la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados; y (g) purificar la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la fase líquida del paso (f).

Ciertos términos se utilizan con un sentido particular, o se definen por primera vez, en esta descripción de la presente invención. Con el propósito de la presente invención, los siguientes términos se definen mediante sus definiciones aceptadas en la materia, cuando éstas existen, excepto cuando estas definiciones entran en conflicto total o parcial con las definiciones establecidas más adelante. En caso de conflicto en la definición, el significado de los términos se definen primero en las definiciones establecidas más adelante.

La identificación de aminoácidos utiliza la abreviaturas de tres letras así como el alfabeto de letra única de los aminoácidos, es decir, Asp D ácido aspártico, Ile I Isoleucina, Thr T Treonina, Leu L Leucina, Ser S Serina, Tyr Y Tirosina, Glu E ácido glutámico, Phe F Fenilalanina, Pro P Prolina, His H Histidina, Gly G Glicina, Lys K Lisina, Ala A Alanina, Arg R Arginina, Cys C Cisteína, Trp W Triptófano, Val V Valina, Gln Q Glutamina, Met M Metionina, Asn N Asparagina. Un aminoácido en una posición particular en una secuencia de aminoácidos viene dada por su abreviatura de tres letras y un número. A modo de ejemplo, en referencia a la secuencia de aminoácidos de la pre-pro carboxipeptidasa B nativa de rata de Id. de Sec. N°: 1, “His14” denota el residuo de Histidina en la posición 14 de aminoácidos.

El término “que comprende” se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones y significa “que incluye, pero no necesariamente se limita a”.

El término “pre-proteína” se refiere a un producto de traducción primaria que comprende en su extremo N-terminal un péptido señal. En el contexto de la presente invención la “pre-proteína” es el precursor del zimógeno o pro-enzima, es decir, la pro-carboxipeptidasa B. La pro-enzima resulta del procesamiento postraduccional de la pre-proteína.

Un “péptido señal” es una secuencia señal de aminoácidos escindible presente en la forma de pre-proteína de una proteína secretable. Las proteínas transportadas a través de la membrana celular, es decir “secretadas”, normalmente poseen una secuencia N-terminal rica en aminoácidos hidrofóbicos de alrededor de 15 a 30 aminoácidos de longitud. Algunas veces durante el proceso del paso a través de la membrana, la secuencia señal se escinde mediante una peptidasa señal (Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (eds), *Molecular Biology of the Cell*, cuarta edición, 2002, Garland Science Publishing). Muchas fuentes de péptido señal son conocidas por los expertos en la materia y pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* y similares. En general, el N-terminal de la pre-proteína de esencialmente cualquier proteína secretada es una fuente potencial de un péptido señal adecuado para utilizar en la presente invención. Un péptido señal puede también estar bipartido que comprende dos péptidos señal que dirigen la pre-proteína a un primer y a un segundo compartimiento celular. Los péptidos señal bipartidos se escinde secuencialmente durante el curso de la ruta de secreción. Un ejemplo preferible de esto es el pre-propéptido del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (Waters *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 6209-14). Otro ejemplo más preferible es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la posición 1 a la posición 255 en el Id. de Sec. N°: 3.

Las pre-proteínas con una péptido señal N-terminal de secreción están dirigidos para entrar en la “ruta de secreción”. La ruta de secreción comprende los procesos de procesamiento post-traduccional y finalmente resulta en la secreción de la procarboxipeptidasa B. En el presente documento se entiende que las proteínas secretadas mediante la cepa de levadura metilotrófica han pasado a través de la ruta de secreción.

El término “procesamiento post-traduccional” denota los pasos de modificación a los que se somete una pre-proteína, para crear una proteína en un compartimiento celular o extracelular. En el contexto de la presente invención, el procesamiento post-traduccional de la pre-pro-carboxipeptidasa B resulta en la pro-carboxipeptidasa B secretada.

La escisión enzimática proteolítica de la pro-carboxipeptidasa B, por ejemplo mediante tripsina, se refiere como “activación”. Los expertos en la materia conocen bien que los eventos moleculares que conducen a la activación dependen del procesamiento proteolítico. La tripsina escinde la pro-carboxipeptidasa B, generando así un “pro-péptido” o “porción de propéptido” enzimáticamente inactivo y una “porción de enzima” proteolíticamente activa, es decir, la carboxipeptidasa B. A modo de ejemplo, la porción de enzima de la pro-carboxipeptidasa B de rata, es decir, la “porción de pro-carboxipeptidasa B” del polipéptido de procarboxipeptidasa B de rata es el polipéptido dado por la secuencia de aminoácidos desde la posición 191 a la posición 497 en el Id. de Sec. N°: 4.

El propéptido de una pro-carboxipeptidasa B normalmente comprende alrededor de 95 aminoácidos. También se conoce que la escisión proteolítica de la pro-carboxipeptidasa B por la tripsina no solo activa la carboxipeptidasa B sino que también puede formar fragmentos tripticos de carboxi-peptidasa B.

Una “levadura metilotrónica” se define como una levadura que es capaz de utilizar metanol como su fuente de carbono. El término también comprende cepas de laboratorio de la misma. En el caso que una cepa de levadura metilotrónica sea auxotrónica y debido a su necesidad de ser suplementada con una sustancia auxiliar que contiene carbono, por ejemplo Histidina en el caso de una cepa de levadura metilotrónica incapaz de sintetizar este aminoácido en una cantidad suficiente, esta sustancia auxiliar se refiere a un nutriente pero no a una fuente de carbono.

Un “vector” se define como DNA que puede comprender, es decir llevar y mantener el fragmento de DNA de la invención, que incluye, por ejemplo, fagos y plásmidos. Estos términos se entienden por los expertos en la materia de la ingeniería genética. El término “casete de expresión” denota una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína, unida de forma operativa a un promotor y a un terminador. Para los vectores que contienen un casete de expresión, los términos “vectores” y “vectores de expresión” son sinónimos.

“Transformación” significa introducir DNA en un organismo de forma que el DNA es replicable, tanto como un elemento extracromosómico como mediante integración cromosómica.

El término “episoma” significa una unidad de material genético compuesto de una serie de genes que algunas veces poseen una existencia independiente en una célula huésped y otras veces se integra en un cromosoma de la célula, replicándose a sí mismo junto con el cromosoma. Un ejemplo de episoma es el vector de la Figura 1.

El término “expresión” y el verbo “expresar” significan transcripción de secuencias de DNA y/o la traducción del mRNA transcrito en un organismo huésped que resulta en una pre-proteína, es decir no incluye el procesamiento post-traduccional.

Una secuencia de nucleótidos “codifica” un péptido o proteína cuando al menos una porción de la secuencia de nucleótidos, o su complementario, puede traducirse directamente para proporcionar la secuencia de aminoácidos del péptido o proteína, o cuando la secuencia de nucleótidos aislada puede utilizarse, sola o como parte de un vector de expresión, para expresar el péptido o proteína *in vitro*, en una célula procariota huésped, o en una célula eucariota huésped.

Toda secuencia de nucleótidos se escribe en la dirección desde el extremo 5’ (representa al primero) hacia el extremo 3’ también referido como de 5’ a 3’.

Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos reguladora que estimula la transcripción. Estos términos se entienden por los expertos en la materia de la ingeniería genética. Como un promotor, un “elemento promotor” estimula la transcripción pero constituye un sub-fragmento de una secuencia promotora más larga.

El término “unido de forma operativa” se refiere a la asociación de dos o más fragmentos de ácido nucleico en un vector único de forma que la función de uno se vea afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está ligado de forma operativa con una secuencia codificante, es decir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o una pre-proteína, cuando es capaz de afectar la expresión de esta secuencia codificante, es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor.

Un “enlace peptídico” es un enlace covalente entre dos aminoácidos en que el grupo amino alfa de un aminoácido está unido al grupo carboxilo alfa del otro aminoácido.

Descripción detallada de la invención

Una primera realización de la invención es un método para producir una proteína con actividad carboxipeptidasa B, que comprende los pasos de a) proporcionar un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en la pro-carboxipeptidasa B de rata que está fusionada en N-terminal a la cola de histidina y un péptido señal, en el que opcionalmente entre la cola de histidina y el péptido señal o entre la cola de histidina y la pro-carboxipeptidasa B de rata se inserta una secuencia espaciadora; (b) transformar un organismo huésped microbiano con el vector; (c) cultivar el organismo huésped microbiano en un medio de cultivo que contiene nutrientes y una fuente de carbono, en el que el organismo huésped microbiano expresa la preproteína y secreta la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina en el medio de cultivo; (d) inmovilizar la pro-carboxipeptidasa B secretada con colas de histidina en el medio de cultivo del paso (c) en una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados capaces de unirse a la cola de histidina, y lavar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, en el que la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina está inmovilizado; (e) incubar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados con la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina del paso (d) en un tampón que contiene tripsina, que escinde así de forma proteolítica la porción de pro-carboxipeptidasa B y liberando la proteína con actividad carboxipeptidasa B en la fase líquida, en la que la porción de propéptido con colas de histidina está inmovilizada; (f) separar la fase líquida que contiene la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, en la que la porción de propéptido con colas de histidina está inmovilizada en la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados; y (g) purificar la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la fase líquida del paso (f).

Cuando se construye un vector que se va a utilizar para la transformación de una cepa de huésped microbiano, por ejemplo una cepa de levadura metilotrónica, algunas técnicas de clonación molecular pueden requerir la adición

de un enlazante o secuencia espaciadora para una secuencia de nucleótidos que codifica un elemento funcional de la pre-proteína. Una secuencia espaciadora puede también generarse, por ejemplo cuando un fragmento de DNA que comprende la secuencia codificante de un elemento funcional de la pre-proteína se escinde de un vector de clonaje utilizando una endonucleasa de restricción que genera un fragmento que es mayor que la secuencia codificante. Otras razones por las que la secuencia enlazante o espaciadora de nucleótidos puede aparecer son posibles. La secuencia de nucleótidos que codifica los elementos funcionales de la pre-proteína respecto a esto codifica (a) el péptido señal, (b) la cola de histidina y (c) la porción de pro-carboxipeptidasa B. Así, respecto a la presencia de dicha secuencia enlazante de nucleótidos, puede insertarse aminoácidos adicionales, es decir una "secuencia espaciadora", en las uniones de dos elementos funcionales cualquiera de la pre-proteína. Un ejemplo de esto es la secuencia espaciadora que consiste en un residuo de Serina y un residuo de Alanina en las posiciones de aminoácido 86 y 87 en el Id. de Sec. N°: 3 e Id. de Sec. N°: 4. Son preferibles en la pre-proteína de la invención las secuencias espaciadoras que consisten en no más de cuatro residuos de aminoácidos. Más preferibles son las secuencias espaciadoras que consisten en dos residuos de aminoácido. La inserción de una secuencia enlazante de nucleótidos que codifica una secuencia espaciadora es "opcional" en el sentido que dicha inserción puede facilitar la unión de la secuencia de nucleótidos separada que codifica dos elementos funcionales, para formar una secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína o un precursor de la misma.

Una cola de histidina es una secuencia de aminoácidos que contiene preferiblemente 6 histidinas consecutivas. Como las histidinas representan la porción esencial, existen otros aminoácidos adicionales comprendidos en la porción de cola de histidina. De forma importante, la cola de histidina utilizada en la presente invención no añade otro sitio de escisión de tripsina relevante a la proteína secretada. Así, el sitio de escisión de tripsina del zimógeno retiene el sitio de escisión preferible bajo las condiciones aplicadas durante la activación en columna de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina inmovilizada. Tras la activación en columna de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina inmovilizada, el propéptido permanece unido a la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados mediante la cola de histidina.

La purificación de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada se facilita mediante la cromatografía por afinidad a metales inmovilizados. Este método es un método ampliamente utilizado para purificar proteínas recombinantes que contienen una cola corta de afinidad que consiste en residuos de histidina (cola de Histidina). La cromatografía por afinidad a metales inmovilizados (descrita en Porath, J. *et al.*, Nature 258 (1975) 598-599) está basada en la interacción entre un metal iónico de transición (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) inmovilizado sobre una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados y cadenas laterales de aminoácido específicos. La histidina es el aminoácido que presenta la interacción más fuerte con las matrices de iones metálicos inmovilizados, como grupos donadores de electrones en el anillo imidazol de la histidina forman fácilmente puentes de coordinación con el metal de transición inmovilizado. Los péptidos que contienen secuencias de residuos de histidina consecutivos se retienen de forma eficiente en la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados. Tras el lavado del material de la matriz, los péptidos que contienen las secuencias de histidina como la cola de histidina pueden eluirse fácilmente ajustando a un pH bajo (ácido) el tampón de columna o mediante la adición de imidazol libre.

El método para purificar proteínas con residuos de histidina se describió por primer vez en Hochuli, E. *et al.*, J. Chromatogr. 411 (1987) 177-184. El documento describe un adsorbente de ácido nitrilotriacético (NTA) para la cromatografía de afinidad por los quelatos metálicos. La resina de NTA forma un quelato cuadridentado y es especialmente adecuado para iones metálicos con números de coordinación de seis, ya que dos valencias permanecen para la unión reversible de biopolímeros. Se ha purificado con éxito la dihidrofolato reductasa con una cola de Histidina con matrices Ni²⁺-NTA como se describe en Hochuli, E. *et al.*, Bio/Technology 6 (1988) 1321-1325. La eficiencia de purificación de este sistema depende de la longitud de la cola de histidina y el sistema de solvente. Mientras que el sistema trabaja eficientemente con proteínas con colas de His₆ bajo condiciones desnaturalizantes, las proteínas con colas de His₃ se purificaron eficientemente bajo condiciones fisiológicas. No obstante, las proteínas con colas de His₆ pueden unirse a matrices Ni²⁺-NTA bajo condiciones no desnaturalizantes en tampones bajos o altos en sal. Tras la unión, la proteína diana puede eluirse mediante un gradiente de imidazol desde 0,8 a 250 mM. Puede utilizarse un lavado con una concentración baja de imidazol (por ejemplo 0,8 mM) para reducir la unión inespecífica de proteínas huésped con histidinas.

En la presente invención, el paso de inmovilización se realiza preferiblemente en presencia de imidazol. Bajo estas condiciones, la unión inespecífica de otras proteínas que contienen histidina se ha visto reducida. Las concentraciones preferibles de imidazol respecto a esto están en el rango entre 0,01 mM y 1 mM.

Otro material que ha sido desarrollado para purificar proteínas con colas de histidina es TALON. Consiste en un carboxilmetilaspártato Co²⁺- (Co²⁺-CMA), que está acoplado a una resina en soporte sólido. TALON se ha descrito por presentar menos unión inespecífica de proteína que la resina de Ni²⁺-NTA, lo que resulta en una mayor pureza del producto de elución (Chaga, G. *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 19-24; Chaga, G. *et al.*, J. Chromatogr. A 864 (1999) 257-256).

Las colas de histidina se sitúan normalmente en cualquiera de los extremos N- o C-terminal de las proteínas recombinantes. La situación óptima de la cola es específica de cada proteína. La purificación utilizando colas de histidina se lleva a cabo con éxito utilizando una serie de sistemas de expresión que incluye a bacterias (Chen, B.P. y Hai, T., Gene 139(1994) 73-75; Rank, K.B. *et al.*, Protein Expr. Purif. 22 (2001) 258-266), levaduras (Borsing, L. *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 240 (1997) 586-590; Kaslow, D.C. y Shiloach, J., Bio/Technology 12 (1994)

494-499), células de mamífero (Janknecht, R. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 8972-8976; Janknecht, R. y Nordheim, A., Gene 121 (1992) 321-324), y células de insectos infectadas con baculovirus (Kuusinen, A. *et al.*, Eur. J. Biochem. 233 (1995) 720-726; Schmidt, M. *et al.* Protein Expr. Purif. 12 (1998) 323-330). Más de 100 estructuras de proteínas con colas de histidina se han depositado en bases de datos de proteínas. Las proteínas con una cola de histidina pueden variar ligeramente en su mosaicidad y difracción al compararlas con la proteína nativa (Hakansson, K. *et al.* Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 56 (2000) 924-926). En principio, no puede excluirse que la cola de histidina pueda interferir con la actividad de proteína (Wu, J. y Filutowicz, M., Acta Biochim. Pol. 46 (1999) 591-599), aunque el tamaño relativamente pequeño y la carga de la cola de histidina aseguran que la actividad de la proteína se vea raramente afectada. Si se mueve la cola de histidina al extremo opuesto (Halliwell, C.M. *et al.*, Anal Biochem. 295 (2001) 257-261) o se lleva a cabo la purificación bajo condiciones desnaturizantes, a menudo se resuelve este problema.

La pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada en el medio de cultivo se inmoviliza en una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados capaz de unirse a la cola de histidina. Por ejemplo, la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina puede adsorberse en los iones metálicos inmovilizados en una resina quelante de metales. Como se ha descrito antes, dichas resinas son bien conocidas por los expertos en la materia. Una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados preferible es material de cromatografía que está recubierto con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). Respecto a esto, el experto en la materia conoce las PE 0 253 303, PE 0 282 042, y PE 1 069 131. Qiagen comercializa el sistema de purificación QIAexpress que puede utilizarse para el paso de inmovilización. La misma empresa proporciona un vector de expresión (pQE) que puede utilizarse para producir polipéptidos de fusión con colas de histidina. Respecto a esto, el experto en la materia también conoce la US 5.284.933 y US 5.310.663.

La purificación de la proteína con un centro de metal puede requerir métodos especialmente adaptados para la purificación debido a que el metal puede ser absorbido por el NTA. La purificación bajo condiciones anaeróbicas pueden también requerir métodos especialmente adaptados para la purificación debido a que el Ni²⁺-NTA se reduce. Sin embargo, la purificación de pre-proteínas con una cola de histidina es uno de los métodos más comúnmente utilizados.

La carboxipeptidasa B contiene Zn²⁺ como cofactor. Por esta razón, en lugar de utilizar Ni²⁺-NTA como matriz para la purificación cromatográfica, es preferible una matriz de afinidad quelante de metal cargada con Zn²⁺. Por lo tanto se evita cualquier sustitución accidental y no deseada del cofactor Zn²⁺ por Ni²⁺.

Una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados aún más preferible está, por lo tanto, cargada con adsorbente quelante de Zn²⁺- StreamlineTM (Amersham Biosciences) (es decir con iones Zn²⁺ inmovilizados en ella). Los adsorbentes StreamlineTM están basados en agarosa. La estructura macroporosa de las matrices de agarosa altamente entrecruzadas combina buena capacidad de unión para grandes moléculas, como proteínas, con gran estabilidad química y mecánica. La gran estabilidad mecánica es una propiedad importante de una matriz a utilizar en cromatografía de lecho expandido para reducir los efectos de desgaste cuando las partículas se mueven libremente en el lecho expandido. Las partículas hechas sólo de material orgánico poseen una densidad limitada y necesitarán tener unos diámetros muy largos para la gran velocidad de sedimentación necesaria. Dichos diámetros de partículas grandes resultan en grandes longitudes de ruta difusional, que provoca una considerable resistencia a la transferencia de masa, contrarrestando la productividad. Los adsorbentes StreamlineTM están por lo tanto basados en una partícula compuesta que contiene un material central inerte que es más denso que los materiales orgánicos. Dichas partículas pueden diseñarse de tal forma que su velocidad de sedimentación es alta también a un tamaño de partícula razonable.

La adsorción en lecho expandido es una operación de un único paso en el que las proteínas deseadas se purifican a partir de un particulado bruto que contiene materia prima sin la necesidad de separar por clarificación, concentración y purificación inicial. La expansión del lecho adsorbente crea una distancia entre las partículas adsorbentes, es decir aumento de nulidad (fracción de volumen nulo) en el lecho, que facilita el pase de células, restos celulares y otras partículas durante la aplicación del material bruto a la columna.

La matriz de afinidad adsorbente por los quelatos metálicos particulados (como el StreamlineTM) se expande y se equilibra al aplicar un flujo líquido ascendente en la columna. Se forma entonces un lecho fluido estable cuando las partículas adsorbentes quedan suspendidas en equilibrio debido al equilibrio entre la velocidad de sedimentación de las partículas y la velocidad de flujo líquido ascendente. El adaptador de columna se posiciona en la parte superior de la columna durante esta fase. Se aplica material bruto, no clarificado, es decir medio de cultivo que contiene la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada y el organismo huésped microbiano, al lecho expandido con el mismo flujo ascendente que el utilizado durante la expansión y equilibrado. La pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina se inmoviliza de modo que se una la cola de histidina al adsorbente mientras que los restos celulares, las células, particulados y contaminantes pasen sin ningún impedimento. El material unido de forma débil, como las células residuales, restos celulares y otro tipo de material particulado, se elimina con lavados del lecho expandido utilizando un flujo líquido ascendente. Cuando el material débilmente retenido ha sido lavado del lecho, la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina capturada se activa mediante una escisión en columna con tripsina, mientras se mantiene el modo de flujo ascendente. La carboxi-peptidasa B se libera y puede lavarse de la columna. El flujo que pasa contiene la proteína diana, en mayor concentración, clarificada, parcialmente purificada, y lista para una posterior purificación mediante cromatografía de lecho empacado.

ES 2 337 684 T3

El uso preferible de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, es decir el adsorbente quelante Streamline™ (Amersham Biosciences) y el ajuste, optimización y realización de la cromatografía de lecho expandido se detalla en profundidad en el manual de Pharmacia Biotech “expanded bed adsorption, principles and methods” (ISBN 91-630-5519-8). Las instrucciones generales para regenerar la columna también se describen allí.

Se puede utilizar un gran número de organismos huésped microbianos en la presente invención. El principal requisito es que el organismo huésped microbiano esté diseñado y cultivado de forma que secreta la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina en el medio de cultivo. En una realización preferible el organismo huésped microbiano es un organismo procarionte. Respecto a esto, el experto en la materia conoce los sistemas bacterianos disponibles comercialmente para la expresión y secreción recombinante que están basados en bacterias como *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* En una realización más preferible el organismo huésped microbiano es un organismo microbiano eucariota. Muy preferible es una especie de levadura. En una realización aún más preferible, el organismo microbiano es una cepa de levadura metilotrónica.

Así, en otra realización de la invención, la pro-carboxipeptidasa B de rata con colas de histidina se produce mediante métodos recombinantes utilizando levadura metilotrónica como un organismo huésped no animal. Las levaduras metilotrónicas poseen las rutas bioquímicas necesarias para la utilización de metanol y se clasifican en cuatro géneros, basados en la morfología celular y características de crecimiento: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, y *Torulopsis*. Los sistemas de huésped metilotrónicos más altamente desarrollados utilizan *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*).

La expresión de proteínas heterólogas en levaduras se describe en US 5.618.676, US 5.854.018, US 5.856.123, y US 5.919.651.

Las levaduras producen una serie de proteínas que se sintetizan intracelularmente pero poseen una función fuera de la célula. Estas proteínas extracelulares son referidas como proteínas secretadas. Inicialmente las proteínas secretadas se expresan dentro de la célula en forma de un precursor o una pre-proteína que contiene un péptido señal N-terminal que asegura la dirección efectiva del producto expresado en la ruta de secreción de la célula, a través de la membrana del retículo endoplasmático. El péptido señal se escinde generalmente del producto deseado durante la translocación. La escisión se efectúa proteolíticamente mediante una peptidasa señal. Una sub-secuencia particular de aminoácidos del péptido señal es reconocida y escindida por la peptidasa señal. Esta sub-secuencia es referida como el sitio de escisión de la peptidasa señal. Una vez dentro de la ruta de secreción, la proteína se transporta al aparato de Golgi. Desde el aparato de Golgi las proteínas se distribuyen a la membrana plasmática, los lisosomas y las vesículas secretoras.

Las proteínas secretadas se enfrentan a diferentes condiciones ambientales opuestas a las proteínas intracelulares. Parte de los procesos de la ruta de secreción es estabilizar la maduración de las proteínas extracelulares. Por lo tanto, las pre-proteínas que han pasado a través de la ruta de secreción de las levaduras sufren un procesamiento postraduccional específico. Por ejemplo, el procesamiento puede comprender la generación de puentes disulfuro para formar entrecruzamientos intramoleculares. Además, ciertos aminoácidos de la proteína pueden glicosilarse.

Se han sugerido varias aproximaciones para la expresión y secreción en levaduras de las proteínas heterólogas en levaduras. La PE 0 116 201 describe un proceso mediante el cual las proteínas heterólogas en levaduras se transforman mediante un vector de expresión portador de un DNA que codifica la proteína deseada, un péptido señal y un péptido que actúa como sitio de escisión de la peptidasa. Se prepara un cultivo del organismo transformado y se hace crecer, y se recupera la proteína del medio de cultivo. Para utilizar en las células de las levaduras se ha encontrado un péptido señal adecuado para ser el péptido señal de factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (US 4.870.008).

Durante la secreción, la enzima KEX-2 de levadura es la peptidasa señal que reconoce una secuencia Lisina-Arginina como su sitio de escisión en la pre-proteína. La KEX-2 rompe en la unión de la secuencia de la proteína deseada. Como resultado, el producto génico deseado se libera y se libera de las porciones líder, es decir el péptido señal de la pre-proteína. La endoproteasa KEX-2 se caracterizó originariamente en la levadura *Saccharomyces* en la que procesa de forma específica el precursor del tipo de apareamiento de factor alfa y un factor asesino (Julius, D., et al., Cell 37 (1984) 1075-1089). Las especies de levaduras metilotrónicas como *Pichia pastoris* comparten la proteasa de tipo KEX-2 (papel y función similar) con *Saccharomyces cerevisiae* (Werten, M.W., et al., Yeast 15 (1999) 1087-1096).

Un ejemplo de especie de levadura metilotrónica bien establecida descrita como un huésped para niveles altos de expresión de proteínas recombinantes es *Pichia pastoris* (US 4.683.293, US 4.808.537, US 4.812.405, US 4.818.700, US 4.837.148, US 4.855.231, US 4.857.467, US 4.879.231, US 4.882.279, US 4.885.242, US 4.895.800, US 4.929.555, US 5.002.876, US 5.004.688, US 5.032.516, US 5.122.465, US 5.135.868, US 5.166.329, WO 00/56903). En ausencia de glucosa, *Pichia pastoris* utiliza metanol como fuente de carbono que a su vez es un distintivo de un organismo metilotrónico. El promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) proporcionado en el Id. de Sec. N°: 5 controla la expresión de la alcohol oxidasa, que cataliza el primer paso en el metabolismo del metanol. Normalmente, el 30% de la proteína soluble total en las células inducidas con metanol es la alcohol oxidasa. Varios vectores de expresión de *Pichia* son portadores del promotor AOX1 y utilizan metanol para inducir altos niveles de expresión de las proteínas heterólogas deseadas. Las construcciones de expresión también se integran en el genoma de *Pichia pastoris*, creando un huésped transformado y genéticamente estable.

ES 2 337 684 T3

Utilizando un vector de expresión que codifica una pre-proteína heteróloga que comprende un péptido señal o un péptido señal con un sitio de escisión de peptidasa señal, y una proteína deseada, la cepa de levadura metilotrónica como las cepas de *Pichia pastoris* pueden manipularse para secretar el producto deseado en el medio de cultivo desde donde la proteína secretada puede purificarse. Puede ser ventajoso producir una secuencia de nucleótidos que codifique la pre-proteína que posea un uso de codón sustancialmente diferente.

Respecto al polipéptido de la pro-carboxipeptidasa B codificado, la secuencia de nucleótidos comprendida en el Id. de Sec. N°: 3 es diferente de la secuencia de nucleótidos anteriormente publicada como Id. de Sec. N°: 1 debido a la degeneración del código genético. La secuencia de nucleótidos de Id. de Sec. N°: 3 desde la posición 286 a la posición 1497 codifica el mismo polipéptido que la secuencia de nucleótidos de Id. de Sec. N°: 1 desde la posición 40 a la posición 1248. No obstante, el Id. de Sec. N°: 3 incorpora dos intercambios de aminoácido, es decir Lys201Asn y Arg329Asp. Estos cambios de aminoácido también están documentados en WO 96/23064. El término “código degenerado” indica que en el código genético un aminoácido particular puede estar codificado por dos o más codones diferentes. La degeneración ocurre gracias al hecho que de los 64 tripletes de bases posibles, 3 se utilizan para codificar las señales de finalización, y las otras 61 codifican los 20 aminoácidos diferentes.

Así, se pueden seleccionar codones para aumentar la frecuencia en la que la expresión de la pre-proteína ocurre en un huésped de expresión particular de levadura de acuerdo con la frecuencia en que los codones particulares se utilizan en el huésped. Otras razones para alterar sustancialmente la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína, sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada, incluye la producción de transcritos de RNA que poseen propiedades más deseables, como una vida media superior, que los transcritos producidos desde la secuencia natural. La secuencia de nucleótidos de Id. de Sec. N°: 3 es un ejemplo para una secuencia codificante que se ha optimizado de esta manera.

Utilizando un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína que es competente para la expresión, es decir unida de forma operativa a un promotor o elemento promotor y a un terminador o elemento terminador, así como a las secuencias necesarias para una traducción eficiente, el organismo huésped se transforma con el vector y se seleccionan los transformantes. Los transformantes se analizan entonces respecto al rendimiento de la proteína recombinante secretada en el medio de cultivo. Los transformantes que secretan las mayores cantidades de proteína recombinante se seleccionan. Así, los transformantes que secretan las mayores cantidades de pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina se seleccionan.

Por una parte, el rendimiento de expresión es dependiente de la localización adecuada del producto deseado, es decir, dirigir la pre-proteína a la ruta de secreción de la levadura mediante el péptido señal. Un ejemplo para un péptido señal es el péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* codificado en el Id. de Sec. N°: 3 desde la posición 1 a la posición 255. Por otro lado, el rendimiento de expresión puede aumentarse al aumentar la dosis del gen que codifica el producto deseado, es decir se amplifica el número de copias de la construcción de expresión en el organismo huésped. Una forma de lograr esto es mediante transformación múltiple de un vector de expresión que codifica el producto deseado. Otra vía es introducir el gen que codifica el producto deseado en el organismo huésped utilizando un primer y un segundo vector de expresión, en el que el segundo vector de expresión está basado en un marcador seleccionable que difiere del marcador seleccionable utilizado en el primer vector de expresión. El segundo vector de expresión que codifica el mismo producto deseado puede incluso introducirse cuando el organismo huésped ya es portador de múltiples copias de un primer vector de expresión (US 5.324.639; Thill, G.P., *et al.*, Positive and Negative Effects of Multi-Copy Integrated Expression in *Pichia pastoris*, International Symposium on the Genetics of Microorganisms 2 (1990), pp. 477-490; Vedvick, T., *et al.*, J. Ind. Microbiol. 7 (1991) 197-201; Werten, M.W., *et al.*, Yeast 15 (1999) 1087-1096).

La secreción de la pro-carboxipeptidasa B dirige la proteína recombinante al espacio extracitoplásmico desde el que se difunde hacia el medio de cultivo. Así, en una realización preferible de la invención la levadura metilotrónica se cultiva en un cultivo líquido y secreta pro-carboxipeptidasa B en el medio de cultivo líquido, es decir el medio de cultivo líquido. Esto permite una separación muy eficiente de la biomasa de la levadura de la proteína recombinante utilizando, por ejemplo técnicas de cromatografía de lecho expandido. Como resultado, la pro-carboxipeptidasa B purificada de la levadura puede librarse de forma eficiente de otras actividades enzimáticas no deseadas.

Respecto al vector con el que, en una realización preferible, la cepa de levadura metilotrónica se transforma, el experto en la materia conoce perfectamente los vectores de expresión que permiten la construcción de polipéptidos de fusión que contienen la denominada “cola de histidina” o “cola de (poli)histidina”. En la pre-proteína preferible de la presente invención, se fusiona una cola de histidina al extremo N-terminal del polipéptido de pro-carboxipeptidasa B. La cola de histidina en total comprende seis residuos consecutivos de histidina. El experto en la materia se dará cuenta respecto a esto que el aminoácido N-terminal del polipéptido de la pro-carboxipeptidasa B es también una histidina. Así, en la secuencia de nucleótidos anotada que codifica la pre-proteína existe un solapamiento de las secuencias codificantes fusionadas en el que el codón de la última histidina de la cola de histidina también representa la primera histidina de la porción pro-carboxipeptidasa B.

Tras la activación, es decir la escisión trípica de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina inmovilizada, la porción de propéptido con cola de histidina permanece unido a la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados. La carboxipeptidasa B activada se libera y se separa en el paso (f) de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados. Así, se separa la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados de la fase

líquida al mismo tiempo que se separa el propéptido de la enzima carboxipeptidasa B. Al utilizar este método se evita la unión no covalente del propéptido a la molécula de carboxipeptidasa B.

Es preferible que el vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en la pro-carboxipeptidasa B de rata que está fusionada en el extremo N-terminal a una cola de histidina (cola de histidina) y un péptido señal, en el que se puede insertar opcionalmente una secuencia espaciadora entre la cola de histidina y el péptido señal. Es más preferible que la secuencia de aminoácidos de la pro-carboxipeptidasa B de rata sea la secuencia de aminoácidos desde la posición 14 a la posición 415 en el Id. de Sec. N°: 3. También es preferible que el péptido señal contenga un sitio de escisión de peptidasa señal que está localizado al lado de la cola de histidina o al lado de la secuencia espaciadora. Es muy preferible que la secuencia de aminoácidos de la pre-proteína expresada sea la secuencia de aminoácidos en el Id. de Sec. N°: 4. Es aún más preferible que la secuencia de nucleótidos que codifica la pro-carboxipeptidasa B de rata sea la secuencia de nucleótidos desde la posición 286 a la posición 1497 en el Id. de Sec. N°: 3. Es aún más preferible que la secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína sea la secuencia de nucleótidos en el Id. de Sec. N°: 3. Es aún más preferible que la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína esté ligada de forma operativa a un promotor o elemento promotor.

Para permitir la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína es preferible que la secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína esté ligada de forma operativa a un promotor o elemento promotor. Es muy preferible un promotor o elemento promotor de *Pichia pastoris*, incluso más preferible es el promotor AOX1 de *Pichia pastoris* que se proporciona en el Id. de Sec. N°: 5. También es preferible que además la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína esté ligada de forma operativa con una secuencia terminador que dirige el final de la transcripción en la cepa de levadura metilotrófica. Es muy preferible un terminador de *Pichia pastoris*, incluso más preferible es el terminador AOX1 de *Pichia pastoris*.

Además es preferible que el vector sea un plásmido que pueda replicarse como un episoma en la cepa de levadura metilotrófica. Así, el plásmido preferible es una molécula de ácido nucleico circular que comprende un origen de replicación que dirige la replicación del episoma en la cepa de levadura metilotrófica. Además, el plásmido comprende un marcador que puede seleccionarse que se expresa en la cepa de levadura metilotrófica, de forma que el marcador que puede seleccionarse permite seleccionar la presencia del plásmido en la cepa de levadura metilotrófica. Un marcador que puede seleccionarse muy preferible es un gen de resistencia a la zeocinaTM, que es la forma nativa o una variante de ingeniería genética del gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt, D., *et al.*, Nucleic acids Res. 18 (1990) 4009; Carmels, T., *et al.*, Curr. Genet. 20 (1991) 309-314). Otro marcador muy preferible que puede seleccionarse confiere resistencia frente a los antibióticos amino-glucósidos como la higromicina y G418 (Southern, P.J., y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) 327-341). Un ejemplo de tal marcador que puede seleccionarse es un gen de la fosfotransferasa de aminoglucósidos.

Además es preferible que un cromosoma artificial que pueda replicarse en la cepa de levadura metilotrófica contenga el vector. Así, el cromosoma artificial preferible es una molécula de ácido nucleico lineal que comprende al menos un origen de replicación, un centrómero y telómeros terminales, de forma que controla la replicación, integridad y distribución mitótica/meiótica del cromosoma artificial en la cepa de levadura metilotrófica. Además, el vector que contiene el cromosoma artificial comprende un marcador que puede seleccionarse que se expresa en la cepa de levadura metilotrófica y que permite seleccionar la presencia del vector en el cromosoma artificial que se replica en la cepa de levadura metilotrófica. Un marcador que puede seleccionarse muy preferible es un gen de resistencia a la zeocinaTM, que está en forma nativa o es una variante artificial del gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*. Otro marcador que puede seleccionarse muy preferible confiere resistencia frente a los antibióticos aminoglucósidos como la higromicina y G418. Un ejemplo de tal marcador que puede seleccionarse es un gen de la fosfotransferasa de aminoglucósidos.

Es incluso más preferible que un cromosoma de la cepa de levadura metilotrófica contenga el vector. Es muy preferible que el vector posea una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia cromosómica, permitiendo así la integración del vector en el cromosoma huésped mediante recombinación específica de lugar. Respecto a esto, el locus AOX1 de *Pichia pastoris* es incluso más preferible como locus para la integración en el cromosoma huésped mediante recombinación específica de lugar. También es muy preferible que el vector comprenda un marcador que puede seleccionarse que se exprese en la cepa de levadura metilotrófica y que permita seleccionar la presencia del vector en la cepa de levadura metilotrófica. Un marcador que puede seleccionarse muy preferible es un gen de resistencia a la zeocinaTM, que está en forma nativa o es una variante artificial del gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*. Otro marcador que puede seleccionarse muy preferible confiere resistencia frente a los antibióticos aminoglucósidos como la Higromicina y G418. Un ejemplo de tal marcador que puede seleccionarse es un gen de la fosfotransferasa de aminoglucósidos.

El experto en la material estará al corriente del hecho de que el rendimiento de la pro-carboxipeptidasa B con cola de histidinas secretada que puede obtenerse del medio de cultivo, como el medio de cultivo líquido, puede aumentarse cuando el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína aumenta. Así, el rendimiento de moléculas de pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretadas que pueden obtenerse a partir del medio de cultivo puede aumentarse si se aumenta el número de copias del vector en el genoma de la cepa de levadura metilotrófica. Por ejemplo, puede aumentarse el número de copias del vector sometiendo la cepa de levadura metilotrófica a repetidas transformaciones del vector y repetidas rondas de selección utilizando concentraciones del agente de selección frente al cual confiere resistencia el marcador selectivo que comprende el vector (US 5.324.639; Thill, G.P.,

et al., Positive and Negative Effects of Multi-Copy Integrated Expression in *Pichia pastoris*, International Symposium on the Genetics of Microorganisms 2 (1990), págs. 477-490; Vedvick, T., *et al.*, J. Ind. Microbiol. 7 (1991) 197-201).

El experto en la materia también es consciente del hecho que pueden realizarse repetidas transformaciones utilizando más de un vector. Por ejemplo, pueden realizarse repetidas transformaciones utilizando un primer y un segundo vector, codificando el primer y el segundo vector la misma pre-proteína, estando el primer y el segundo vector la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína ligada de forma operativa a un promotor o elemento promotor, expresándose la misma pre-proteína y secretándose la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina, y confiriendo el primer y el segundo vector resistencia a un primer y un segundo marcador de selección.

Un ejemplo de un primer marcador de selección es el gen *Sh ble*, que es el gen de resistencia a zeocina™ (Drocourt, D., *et al.*, Nucleic Acids Res. 18 (1990) 4009; Carmels, T., *et al.*, Curr. Genet. 20 (1991) 309-314). La proteína codificada por el gen *Sh ble* se une a zeocina™ de forma estequiométrica y con una elevada afinidad. La unión de la zeocina™ inhibe su actividad tóxica, por lo que se seleccionan los transformantes que contienen el gen *Sh ble*. Un experto en la materia conocerá que al aumentar la concentración de zeocina™ como agente de selección en el medio se selecciona un aumento en el número de copias del vector que expresa el gen *Sh ble*. Por lo tanto es ventajoso utilizar un vector con el gen *Sh ble* como marcador de selección para generar mediante transformación repetida transformantes múltiples de la cepa de levadura metilotrófica que contiene múltiples copias del vector. Además es ventajoso que las transformaciones se repitan y la selección de transformantes incluso más resistentes se repitan hasta que ya no se obtengan más aumentos en el nivel de resistencia a la zeocina™ en la cepa de levadura metilotrófica transformada o ya no sea posible aumentar más la concentración de zeocina™ en el medio de selección.

En el caso de utilizar un primer y un segundo vector, un ejemplo del segundo marcador de selección es la resistencia frente a antibióticos aminoglucósidos (Southern, P.J., y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) 327-341) como G418. Así, un segundo vector de ejemplo expresa un gen de resistencia que confiere resistencia frente a G418. Por ejemplo, se conocen varias fosfotransferasas de aminoglucósidos que confieren resistencia a los antibióticos aminoglucósidos (van Treeck, U., *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 19 (1981) 371-380; Beck, E., *et al.*, Gene 19 (1982) 327-336). La enzima fosfotransferasa de aminoglucósidos I (APH-I) tiene la capacidad de inactivar el antibiótico G418 y es un marcador establecido que puede seleccionarse en levaduras (Chen, X.J., Fukuhara, H., Gene, Vol. 69 (1988) 181-192).

Así, con el propósito de aumentar más la dosis de la secuencia de nucleótidos que codifican la pre-proteína, el segundo vector se utiliza de forma ventajosa en nuevas rondas de transformación y selección, siendo en este caso un agente de selección preferible G418 y utilizándose para la transformación la cepa de levadura metilotrófica transformada con el primer vector.

Además es preferible que la cepa de levadura metilotrófica sea de la especie *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* o *Torulopsis*. En una realización muy preferible de la invención, la cepa de levadura metilotrófica se selecciona de entre el grupo que consiste en *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y *Torulopsis glabrata*.

Las cepas de *Pichia pastoris* incluso más preferibles están depositadas en la American Type Culture Collection (ATCC) con los números de registro 201178, 201949, 204162, 204163, 204164, 204165, 204414, 204415, 204416, 204417, 20864, 28485, 34614, 60372, 66390, 66391, 66392, 66393, 66394, 66395, 76273, 76274 y 90925.

Incluso más preferible es la cepa de levadura metilotrófica de *Pichia pastoris* con el número de registro de la American Type Culture Collection 76273 o un derivado de la misma.

Las cepas de *Hansenula polymorpha* incluso más preferibles están depositadas en la American Type Culture Collection con los números de registro 14754, 200499, 200500, 200501, 200502, 200503, 200504, 200505, 200506, 200507, 200508, 200509, 200510, 200511, 200512, 200513, 200838, 200839, 201322, 204205, 22023, 26012, 34438, 36669, 38626, 44954, 44955, 46059, 48180, 58401, 62809, 64209, 66057, 76722, 76723, 76760, 90438, 96694, 96695, MYA-335, MYA-336, MYA-337, MYA-338, MYA-339 y MYA-340.

Las cepas de *Candida boidinii* incluso más preferibles están depositadas en la American Type Culture Collection con los números de registro 18810, 201209, 20432, 26175, 32195, 32929, 36351, 38256, 38257, 44637, 46498, 48180, 56294, 56507, 56897, 60364, 62807, 90439, 90441, 96315 y 96926.

Las cepas de *Torulopsis glabrata* incluso más preferibles están depositadas en la American Type Culture Collection con los números de registro 15126, 15545, 2001, 22019, 26512, 28226, 28290, 32312, 32554, 32936, 34147, 34449, 36909, 38326, 4135, 46433, 48435, 58561, 66032, 750 y 90030.

Otra realización de la invención es una cepa transformada de *Pichia pastoris* con un cromosoma que contiene un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en la pro-carboxipeptidasa B de rata que está fusionada en N-terminal a una cola de histidinas y un péptido señal, ligado de forma operativa con el promotor AOX1 de *Pichia pastoris* de acuerdo con el Id. de Sec. N°: 5 o un elemento promotor del mismo, siendo la secuencia de nucleótidos que codifica la preproteína la secuencia de nucleótidos del Id. de Sec. N°: 3. También es preferible que el vector comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique una pre-proteína que consista en la pro-carboxipeptidasa B de rata fusionada en N-terminal con una cola de histidinas y un péptido señal, pudiendo estar opcionalmente insertada entre la cola de histidinas y el péptido señal una secuencia espaciadora.

Otra realización más de la invención es una proteína con actividad carboxipeptidasa B que está sustancialmente libre del propéptido de la carboxipeptidasa B, que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con la invención. El término “sustancialmente libre” indica que el propéptido está por debajo de los niveles de detección utilizando métodos de detección de espectroscopía de masas. Un análisis de ejemplo se describe en el Ejemplo 8.

Como se indica en el Ejemplo 8, la proteína purificada con actividad carboxipeptidasa B predominantemente carece de una tirosina en C-terminal (Tyr497 en el Id. de Sec. N°:4). Sólo una pequeña fracción de proteína purificada aún contiene este aminoácido. Por lo tanto, de acuerdo con la invención la proteína con actividad carboxipeptidasa B que está sustancialmente libre de propéptido de la carboxipeptidasa B posee la secuencia de aminoácidos del Id. de Sec. N°:4 desde la posición 191 a la posición 496.

El ejemplo 9 ilustra que tras el primer paso de purificación de acuerdo con el Ejemplo 7 las fracciones agrupadas recogidas contienen producto en cantidades casi idénticas de producto con y sin la tirosina en C-terminal. Durante el proceso los residuos de tirosina en C-terminal se eliminan progresivamente. Tras el segundo paso de purificación cromatográfica la especie proteica predominante carece de la tirosina en C-terminal casi completamente. Una posible explicación de ello pero que no se ha comprobado es que el organismo huésped utilizado para la expresión y secreción del producto produce una proteína con actividad carboxipeptidasa Y. Es conocido que la carboxipeptidasa Y de *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de escindir aminoácidos en C-terminal con una especificidad amplia. Aunque se sabe que la carboxipeptidasa Y es una enzima vacuolar (Kato, M. *et al.* Eur. J. Biochem 270 (2003) 4587-4593), las células de levaduras lisadas podrían hacer que aumente notablemente la actividad carboxipeptidasa Y en el medio de fermentación. Sin embargo, como la eliminación de la tirosina en C-terminal deja invariables las propiedades generales enzimáticas de la proteína con actividad carboxipeptidasa B y ya que no se eliminan más aminoácidos del extremo C-terminal, la inactivación o separación adicional de la hipotética actividad carboxipeptidasa Y no se considera necesaria.

Otra realización de la invención es la utilización de una proteína con actividad carboxipeptidasa B que está sustancialmente libre de propéptido de la carboxipeptidasa B de acuerdo con la invención, para la escisión proteolítica de un enlace peptídico. Es preferible que la escisión de un enlace peptídico se efectúe catalizando la hidrólisis de los aminoácidos básicos lisina, arginina y ornitina de la posición C-terminal en un polipéptido. Además es preferible que la secuencia de aminoácidos de la proteína con actividad carboxipeptidasa B posea la secuencia de aminoácidos de la posición 191 a la posición 496 del Id. de Sec. N°: 4.

Es muy preferible la utilización de una proteína con actividad carboxipeptidasa B que está sustancialmente libre de propéptido de la carboxipeptidasa B de acuerdo con la invención y que se caracteriza por escindir un enlace peptídico de un precursor de la insulina. Estos procesos se han descrito, por ejemplo, en la PE 0 264 250 y PE 0 195 691. De acuerdo con ello, un precursor de la insulina se escinde proteolíticamente mediante tripsina y una proteína con actividad carboxipeptidasa B. Es incluso más preferible que la proteína con actividad carboxipeptidasa B catalice la escisión hidrolítica de los aminoácidos básicos lisina, arginina y ornitina de la posición C-terminal del producto de proteólisis triptica del precursor de insulina.

Otra realización de la invención es una solución de reactivo que contiene una proteína con actividad carboxipeptidasa B que está sustancialmente libre de propéptido de la carboxipeptidasa B, de acuerdo con la invención. Es preferible que la proteína con actividad carboxipeptidasa B en la solución de reactivo sea capaz de catalizar la escisión hidrolítica de los aminoácidos básicos lisina, arginina y ornitina de la posición C-terminal de un péptido o polipéptido. Es incluso más preferible que la secuencia de aminoácidos de la proteína con actividad carboxipeptidasa B en la solución de reactivo sea la secuencia de aminoácidos de la posición 191 a la posición 496 del Id. de Sec. N°: 4. Una solución de reactivo que contiene una proteína con actividad carboxipeptidasa B normalmente es una solución acuosa que además contiene sales tamponadoras. Sin embargo, son posibles otros componentes y son bien conocidos para el experto en la materia. Un ejemplo de componentes adicional es la tripsina.

Los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras se proporcionan para mejorar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se fija en las reivindicaciones. Se entenderá que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 Representación gráfica del vector pCPB-1. El vector contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una preproteína, que es una proteína de fusión que comprende el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (indicado “factor-alfa-SS”) y la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina. La secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína está bajo el control transcripcional del promotor AOX1 (indicado “Promotor AOX1”) y el terminador AOX1 (indicado “AOX1-TT”). El vector confiere resistencia frente a la zeocina®.

Figura 2a Diagrama que representa un ejemplo del resultado de un análisis mediante espectrometría de masas de una preparación de carboxipeptidasa B de acuerdo con el Ejemplo 8. El eje x indica los valores m/z (m = masa iónica; z = carga iónica). Los asteriscos indican los picos que corresponden a los respectivos dímeros de carboxipeptidasa B.

Figura 2b Diagrama que representa un ejemplo del resultado de un análisis mediante espectrometría de masas de una preparación de carboxipeptidasa B de acuerdo con el Ejemplo 8. El eje x indica el peso molecular iónico en [Da].

ES 2 337 684 T3

Figura 3 La sección (a) muestra los hipotéticos valores m/z y los picos que corresponden al propéptido de la carboxipeptidasa B, también denominado el péptido de 12.132 Da. La sección (b) muestra el correspondiente recorte del espectro de acuerdo con la Figura 1a. Los ejes x de las secciones (a) y (b) están alineados y tienen una escala idéntica.

Figura 4 La sección (a) muestra los hipotéticos valores m/z y los picos que corresponden al propéptido de la carboxipeptidasa B, también denominado el péptido de 10.746 Da. La sección (b) muestra el correspondiente recorte del espectro de acuerdo con la Figura 1a. Los ejes x de las secciones (a) y (b) están alineados y tienen una escala idéntica.

Figura 5 Recorte de un espectro obtenido con la preparación de enzima de acuerdo con el Ejemplo 8.

Figura 6 Diagrama que representa el resultado del análisis de espectrometría de masas de una preparación de carboxipeptidasa B. El análisis se realizó sobre una muestra tomada tras la cromatografía de lecho expandido, como se explica en el Ejemplo 9. El eje x de la sección (a) indica los valores m/z (m = masa iónica; z = carga iónica). El eje x de la sección (b) indica el peso molecular del ion en [Da].

Figura 7 Diagrama que representa el resultado del análisis de espectrometría de masas de una preparación de carboxipeptidasa B. El análisis se realizó sobre una muestra tomada tras la Q-Sepharose ffTM, como se explica en el Ejemplo 9. El eje x de la sección (a) indica los valores m/z (m = masa iónica; z = carga iónica). El eje x de la sección (b) indica el peso molecular del ion en [Da].

Figura 8 Diagrama que representa el resultado del análisis de espectrometría de masas de una preparación de carboxipeptidasa B. El análisis se realizó sobre el producto final del procedimiento de purificación, como se explica en el Ejemplo 9. El eje x de la sección (a) indica los valores m/z (m = masa iónica; z = carga iónica). El eje x de la sección (b) indica el peso molecular del ion en [Da].

Ejemplo 1

Síntesis del gen que codifica la pre-proteína

Las técnicas de DNA se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar (Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001). Los reactivos para el trabajo molecular se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones de los suministradores.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un gen artificial de la pre-pro-carboxipeptidasa B de acuerdo con Id. de Sec. N°: 3 se sintetizó de novo. Las porciones de la secuencia de nucleótidos se sintetizaron como 24 oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla con una longitud entre 54 y 90 nucleótidos. Los oligonucleótidos de cadena sencilla representan una forma alternante de porciones solapantes de la cadena conductora y la cadena retardada de Id. de Sec. N°: 3. Cada oligonucleótido se diseñó de forma que los extremos 5' y 3' se solapan con el oligonucleótido colindante. Como excepción, los oligonucleótidos que representan los extremos 5' y 3' de Id. de Sec. N°: 3 sólo se solapan con los extremos 3' y 5' de los fragmentos colindantes, respectivamente. Las secuencias de los solapamientos se escogen de forma que se evite la hibridación inespecífica durante la reacción de hibridación. Los oligonucleótidos que representan los extremos 5' y 3' de Id. de Sec. N°: 3 contienen de forma adicional secuencias enlazantes con sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción, para facilitar los siguientes pasos de clonaje molecular, como la inserción de la secuencia codificante artificial dentro de los vectores de expresión. Un sitio de restricción preferible para los oligonucleótidos que representan el extremo 5' de Id. de Sec. N°: 3 es XhoI. Un sitio de restricción preferible para los oligonucleótidos que representan el extremo 3' de Id. de Sec. N°: 3 es NotI.

Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 3 se sintetizó secuencialmente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En principio, los dos primeros oligonucleótidos que representan porciones adyacentes y parcialmente solapadas de la cadena conductora y la retardada se añadieron a la mezcla de reacción de PCR. Tras varios ciclos de PCR, se obtuvo un fragmento contiguo de doble cadena que representa ambas porciones de la cadena conductora y la retardada. El fragmento de doble cadena se purificó opcionalmente, se mezcló con el oligonucleótido consecutivo adyacente y parcialmente solapado de cadena sencilla y se sometió a otra ronda de PCR.

Utilizando el procedimiento descrito antes, se sintetizaron de forma independiente tres fragmentos más grandes de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con Id. de Sec. N°: 3. Cada fragmento puede estar presente en una mezcla de productos derivados. Por lo tanto, los fragmentos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa y se identificaron por su tamaño. Se escindieron los bloques de agarosa que contienen los fragmentos deseados y los fragmentos de DNA se aislaron utilizando el equipo de extracción en gel QiaQuick (Qiagen). También son posibles otros métodos de extracción.

De los tres fragmentos, el segundo fragmento en su extremo 5' posee una secuencia que se solapa con el extremo 3' del primer fragmento, y en el que el segundo fragmento en su extremo 3' posee una secuencia que se solapa con el extremo 5' del tercer fragmento. La secuencia completa de acuerdo con Id. de Sec. N°: 3 se sintetizó de nuevo

ES 2 337 684 T3

secuencialmente. Los tres fragmentos se unieron en una mezcla de reacción de PCR. Las temperaturas de hibridación se escogieron teniendo en cuenta la secuencia solapante con el punto de fusión más bajo. Se realizaron cinco ciclos de PCR, seguidos de la adición de un par adicional de cebadores complementarios al extremo 5' y al extremo 3' del producto de longitud completa deseado. Utilizando una temperatura de hibridación escogida respecto a la temperatura de hibridación del cebador recién añadido con la menor temperatura de fusión, se realizaron otros 25 ciclos de PCR y se obtuvo el fragmento de longitud completa que comprende la secuencia de nucleótidos de Id. de Sec. N°: 3. El fragmento de longitud completa (es decir, la pre-proteína de longitud completa que codifica el DNA que incluye las secuencias enlazantes con sitios de escisión de endonucleasas de restricción) se insertó en un vector y se propagó en un organismo huésped transformado. Un organismo huésped preferible con el fin de propagación es *E. coli*.

La secuencia de nucleótidos del DNA de longitud completa que comprende la secuencia que codifica la pre-proteína de Id. de Sec. N°: 4 se verificó mediante secuenciación. El producto final de longitud completa se amplificó mediante PCR.

Ejemplo 2

Construcción de vectores, transformación y expresión

Para pasos adicionales respecto a la construcción de vectores de expresión, transformación y expresión de la pre-proteína y secreción de pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina en un medio de cultivo, se aplican los métodos sugeridos y descritos en los manuales de Invitrogen "Pichia Expression Kit" Versión M 011102 25-0043, "pPICZ A, B, y C" Versión D 110801 25-0148, "pPICZa A, B, y C" Versión E 010302 25-0150, y "pPIC9K" Versión E 030402 25-0106. También se hace referencia a otros vectores, cepas de levadura y medios mencionados. Los métodos básicos de biología molecular se aplican como se describe en Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001.

Como resultado, se obtienen varios vectores en los que cada uno comprende un casete de expresión capaz de expresar la pre-proteína de acuerdo con Id. de Sec. N°: 4 en cepas de levadura metilotrófica. Una cepa de levadura preferible es una cepa de *Pichia pastoris*. Cada vector además comprende, entre otros elementos genéticos, un origen de replicación capaz de replicar el vector de forma autónoma en células de levadura metilotrófica. Además los vectores se diseñaron de forma que permiten la integración en el genoma de la célula huésped. Otro elemento genético en cada vector es otro casete de expresión que expresa un marcador de selección.

Se realizaron repeticiones de las transformaciones de la cepa huésped *Pichia pastoris* para aumentar el rendimiento de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada.

Ejemplo 3

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la carboxipeptidasa B purificada de rata se realizó mediante la medición de la extinción a 280 nm utilizando cubetas de 1 cm de ancho. La concentración se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína [mg/ml]} = \frac{10 [\text{mg/ml}] * \Delta E_{\text{sonda}} * \text{factor de dilución}}{21,4}$$

Ejemplo 4

Actividad de la proteína

La actividad de la carboxipeptidasa B se determinó utilizando hipuril-L-Arginina 1,5 M (Bachem G-2265) en Tris pH 7,8 100 mM a 25°C y cubetas de 0,5 cm de ancho.

Ejemplo 5

Análisis de HPLC

La activación de la carboxipeptidasa B a partir de pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina se monitorizó utilizando HPLC (cromatografía líquida de alta presión) y medios de separación por filtración en gel (Superdex 75 HR 10/30, Amersham Biosciences). El tampón de cromatografía fue de Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,3 M. la tasa de flujo fue de 0,5 ml/min.

ES 2 337 684 T3

Los tiempos de retención de la carboxipeptidasa B y de la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina difieren sin ambigüedades (1,2 ml) facilitando su reconocimiento en los perfiles de elución.

5 Ejemplo 6

Fermentación

Se siguieron los métodos generales de acuerdo con las descripciones en la literatura (Higgins, D.R., Cregg, J.M. (1998) *Pichia* Protocols. en: *Methods in Molecular Biology* Vol. 103, el documento entero pero en particular las págs. 107-120; Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M. (1998) High cell-density fermentation. en: *Pichia Fermentation Guidelines*, Invitrogen).

Se realizaron los pre-cultivos de la cepa de *Pichia pastoris* transformada capaz de expresar la pre-proteína de Id. de Sec. N°: 4 a 30°C en medio para levadura con base de nitrógeno sin aminoácidos (DIFCO). El pre-cultivo se utilizó para inocular un medio de fermentación. El medio de fermentación contiene minerales, es decir, H₃PO₄, CaSO₄ x 2 H₂O, K₂SO₄, MgSO₄ x 7 H₂O, KOH, NaOH, los elementos traza CuSO₄ x 5 H₂O, KJ, MnSO₄ x H₂O, Na₂MoO₄ x 2 H₂O, H₃BO₄, ZnCl₂, CoCl₂ x 6 H₂O, y FeSO₄ x 7 H₂O. El medio de fermentación también contiene biotina y glicerol. El pH se ajustó a pH 5,0 y se mantuvo a ese valor utilizando NH₃ que al mismo tiempo sirvió como fuente de nitrógeno.

Cuando el glicerol como primera fuente de carbono se agota, se añade metanol, induciendo de esta manera la expresión de la pre-proteína dirigida por el promotor AOX1.

25 Ejemplo 7

Purificación

La fracción de la masa líquida del caldo de fermentación se ajustó al 5-13% al añadir un tampón que contiene Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 1M e imidazol 1 mM. El caldo de fermentación diluido se pasó a través de una columna con una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados. La matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados preferible fue quelante Streamline™ cargado con Zn²⁺ (Amersham Biosciences). La carga de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados en la columna con pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina se realizó utilizando la técnica de cromatografía de lecho expandido. Bajo las condiciones descritas anteriormente, la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina en el caldo de fermentación diluido se une, es decir se adsorbe a la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados.

Tras el paso de unión, la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados en la columna (aún expandida) se lavó con un tampón de lavado que contenía Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 1 M, e imidazol 1 mM. Se realizaron varios (al menos dos) pasos de lavado bajo condiciones que permiten a la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina permanecer unida a la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados. El primer paso de lavado se realizó utilizando el tampón de lavado que contiene adicionalmente un 11% [volumen/volumen] de glicerol. Cualquier paso de lavado adicional se realizó utilizando el tampón de lavado sin glicerol.

La activación de la carboxipeptidasa B se efectuó mediante la escisión es columna con tripsina. Tras el paso de lavado, se bombeó un tampón (Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 1M e imidazol 1 mM) con tripsina (13-20 U/ml) a través de la columna, en la que el tampón que ha salido de la columna se recircula de nuevo en la columna. Tras 150-300 min., se retira el tampón que ahora contiene adicionalmente la carboxipeptidasa B activada. Se lava la columna (de dos a tres pasos de lavado) con un flujo ascendente utilizando tampón de lavado, en el que se recoge el flujo pasante. El tampón que ahora contiene adicionalmente la carboxipeptidasa B activada y el flujo pasante de los pasos de lavado se unifica. La actividad trípica se detiene al añadir clorhidrato de benzamidinio a una concentración final de 1 mM.

El tampón que contiene carboxipeptidasa B activada y tripsina se filtró para eliminar las últimas trazas de biomasa residual. El tampón filtrado se sometió a diafiltración mediante filtración de flujo tangencial. Se utilizó un tampón de diálisis que contenía Tris pH 8,3 a una concentración de 60-100 mM, y otro que contiene clorhidrato de benzamidinio 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM. La diafiltración resultó en un intercambio de tampón en el que estaba presente la carboxipeptidasa activada.

El posterior paso fue la cromatografía en Q-Sepharose ff™. El tampón en el que estaba presente la carboxipeptidasa activada se cargó en una columna que contenía Q-Sepharose ff™. Se aplicó un paso de lavado utilizando Tris pH 8,3 60-100 mM, clorhidrato de benzamidinio 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM. Tras el paso de lavado, la columna se eluyó al aplicar un gradiente hasta NaCl 125 mM. Se recogieron las fracciones. Se unieron las fracciones que contienen carboxipeptidasa B.

65

ES 2 337 684 T3

Ejemplo 8

Espectrometría de masas de carboxipeptidasa B purificada

5 La carboxipeptidasa B se purificó de acuerdo con el Ejemplo 7. Antes de la espectrometría de masas la preparación de enzima se desaló utilizando un dispositivo de micro HPLC (ABI-120A) equipado con un muestreador automático (Gilson 234). La columna utilizada fue Vydac protein C4 cartridge (núm. de catálogo de Vydac 214GD51) junto con la funda apropiada. Se cargó en la columna una alícuota de la preparación de enzima que contiene 50 μg -100 μg de proteína y se eluyó utilizando un gradiente de tampón de elución A (3.5% de HCOOH de calidad “pro análisis” [ácido fórmico] en agua de calidad para HPLC [Baker]) y tampón B (80% acetonitrilo de calidad para HPLC, 5% HCOOH de calidad para HPLC en agua de calidad para HPLC [Baker]). Se aplicó el gradiente eluyendo durante los primeros 5 min. con 5% de tampón B, 95% de Tampón A y luego 3 minutos más con 100% de tampón B. Durante la HPLC la temperatura de la columna se mantuvo a 35°C. La enzima se detectó a una longitud de onda de 280 nm. Se encontró que la enzima ese eluyó entre $t_{5 \text{ min}}$ y $t_{8 \text{ min}}$. El pico de proteína se recogió (desde 30 mAU-40 mAU; pico máximo >80 mAU).

La espectrometría de masas se realizó en un Q-ToF 2TM (Waters Micromass, Manchester, UK) equipado con una interficie de nanopulverización. El dispositivo fue capaz de seleccionar iones de péptido o proteína con una m/z de 200-2000 e iones de proteína con una m/z de 800-2000. Los capilares de pulverización eran de Proxeon (“Mediano”, Núm. de catálogo ES 387). Se tomaron mediciones utilizando parámetros variables respecto al voltaje capilar, voltaje en cono, y perfiles de EM. Los parámetros se ajustaron para cada muestra a analizar respecto al rango de medición. Se utilizó para el análisis el programa MassLynx 4.0TM con el paquete MaxEnt 1TM (Waters). Al utilizar el procesamiento de Máxima Entropía aplicada a los datos de espectrometría de masas, MaxEnt 1TM ayuda a potenciar el espectro complejo permitiendo la deconvolución de espectro solapante cargado de forma múltiple producido por el análisis de mezclas de proteína. Las masas indicadas por debajo de 10.000 Da son monoisotópicas, las masas indicadas como igual o por encima de 10.000 Da son masas medias.

Gracias a la espectrometría de masas se ha encontrado que la preparación de enzima, es decir, la carboxipeptidasa B purificada da lugar a esencialmente tres picos de masa diferentes: (1) el pico principal [denominado A en la Figura 2b] que corresponde a una masa (media) de 35.015 Da que indica la carboxipeptidasa B carente de la tirosina C-terminal; (2) también se encontró un pico menor que corresponde a una masa de alrededor de 70.026 Da (no mostrado) y que indica el dímero de carboxipeptidasa B que carece de la tirosina C-terminal; (3) un pico menor que corresponde a una masa de alrededor de 35.176 Da que indica la carboxi-peptidasa B incluyendo la tirosina C-terminal.

En teoría, los picos que corresponden al propéptido con colas de histidina refleja los 12.132 Da del péptido de 105 aminoácidos generado de la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 4 mediante (a) la escisión de la peptidasa señal KEX-2 entre la Arg85 y la Ser86 y (b) la escisión de la tripsina entre la Arg190 y la Ala191. También pueden postularse los fragmentos del propéptido con colas de histidina. Estos incluyen el péptido de 10.746 Da que comprende la secuencia desde la Ser86 a la Arg178 y el péptido de 1.404 Da que comprende la secuencia desde la Asn179 a la Arg190. Las secciones “(a)” de las Figuras 3 y 4 indican los picos hipotéticos que uno puede esperar si los péptidos de 12.132 Da y 10.746 Da están presentes en la preparación de enzima. Las secciones “(b)” representan recortes aumentados del espectro como el mostrado en la Figura 2a. Se puede observar que en las posiciones de los picos hipotéticos no se detecta nada en el espectro de la preparación de enzima. Además, la Figura 5 muestra un recorte de un espectro obtenido de la preparación de enzima. El péptido hipotético de 1.404 Da se esperaba que diera lugar a picos con una m/z = 702, 8 ([M+2H]²⁺) y m/z = 468, 9 ([M+3H]³⁺). No obstante, no existen picos visibles que indiquen la presencia del propéptido.

Además, se determinó la secuencia de aminoácido N-terminal del polipéptido que corresponde con el pico principal. Se encontró que los 15 aminoácidos en N-terminal eran “ASGHSYTKYNNWETI”. Estos son los mismos que los aminoácidos 191 a 205 de Id. de Sec. N°: 4, es decir, representan el N-terminal de la enzima carboxipeptidasa B activada.

Ejemplo 9

Eliminación de la tirosina en C-terminal

La carboxipeptidasa B se purificó de acuerdo con el Ejemplo 7. Se tomó una muestra de las fracciones que contienen carboxipeptidasa B agrupadas y de las soluciones de lavado. Se realizó una espectrometría de masas de acuerdo con el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 6. La Figura 7 ilustra los resultados de una muestra tras la cromatografía en Q-sepharose ffTM y la Figura 8 ilustra el producto final. Queda claro que al inicio alrededor de un 50% o más de la carboxipeptidasa B contiene la tirosina en C-terminal. Tras la segunda cromatografía la especie proteica predominante ya carece de la tirosina en C-terminal. Sin embargo, la degradación en C-terminal quedó restringida a la tirosina en C-terminal.

Listado de referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (Ed), *Molecular Biology of the Cell*, cuarta edición, 2002, Garland Science Publishing

- 5 **Beck, E., et al.,** *Gene* 19 (1982) 327-336
- Borsing, L. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 (1997) 586-590
- 10 **Carmels, T., et al.,** *Curr. Genet.* 20 (1991) 309-314
- Chaga, G. et al.,** *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 19-24
- 15 **Chaga, G. et al.,** *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 257-256
- Chen, B.P. y Hai, T.,** *Gene* 139 (1994) 73-75
- Chen, X.J., Fukuhara, H.,** *Gene*, Vol. 69 (1988) 181-192
- 20 **Clauser E. et al.,** *J. Biol. Chem.* 1988, Vol. 263, 17837-45
DE 19 915 938
- Drocourt, D., et al.,** *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 4009
- 25 PE 0 116 201
 PE 0 195 691
- 30 PE 0 253 303
 PE 0 264 250
 PE 0 282 042
- 35 PE 1 069 131
- Folk J. B** Carboxypeptidase, en: *The Enzymes* 3, P. Boyer, *Academic Press*, NY, 57, 1971
- 40 **Folk, J., Gladner, J.:** *Biochim Biophys Acta* (1961) 48, 139-47
- Hakansson, K. et al.** *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56 (2000) 924-926
- 45 **Halliwell, C.M. et al.,** *Anal Biochem.* 295 (2001) 257-261
- Higgins, D.R., Cregg, J.M. (1998)** Pichia Protocols. en: *Methods in Molecular Biology* Vol. 103, el documento completo pero en particular las págs. 107-120
- 50 **Hochuli, E. et al.,** *Bio/Technology* 6 (1988) 1321-1325
- Hochuli, E. et al.,** *J. Chromatogr.* 411 (1987) 177-184
- Janknecht, R. Nordheim, A.,** *Gene* 121 (1992) 321-324
- 55 **Janknecht, R. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 8972-8976
- Julius, D. et al.,** *Cell* 37 (1984) 1075-1089
- Kaslow, D.C. Shiloach, J.,** *Bio/Technology* 12 (1994) 494-499
- 60 **Kato, M. et al.** *Eur. J. Biochem* 270 (2003) 4587-4593
- Kuusinen, A. et al.,** *Eur. J. Biochem.* 233 (1995) 720-726
- 65 Pharmacia Biotech manual "Expanded bed adsorption, principles and methods". ISBN 91-630-5519-8
- Porath, J. et al.,** *Nature* 258 (1975) 598-599

ES 2 337 684 T3

Rank, K.B. et al., *Protein Expr. Purif.* 22 (2001) 258-266

Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición, *CSHL Press*, 2001

5 **Schmidt, M. et al.** *Protein Expr. Purif.* 12 (1998) 323-330

Southern, P.J., y **Berg, P.**, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982) 327-341

10 **Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M.** (1998) High cell-density fermentation. en: *Pichia Fermentation Guidelines*, Invitrogen

Thill, G.P. et al., Positive and Negative Effects of Multi-Copy Integrated Expression in *Pichia pastoris*, *International Symposium on the Genetics of Microorganisms 2* (1990), págs. 477-490

15 US 4.683.293

US 4.808.537

US 4.812.405

20 US 4.818.700

US 4.837.148

25 US 4.855.231

US 4.857.467

US 4.870.008

30 US 4.879.231

US 4.882.279

35 US 4.885.242

US 4.895.800

US 4.929.555

40 US 5.002.876

US 5.004.688

45 US 5.032.516

US 5.122.465

US 5.135.868

50 US 5.166.329

US 5.284.933

55 US 5.310.663

US 5.324.639

US 5.618.676

60 US 5.854.018

US 5.856.123

65 US 5.919.651

ES 2 337 684 T3

Van **Treack**, U. *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.* 19 (1981) 371-380

Vedvick, T., *et al.*, *J. Ind. Microbiol.* 7 (1991) 197-201

5 **Ventura et al.** *J. Biol. Chem.* (1999) 274(28), 19925-33

Waters et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 6209-14

10 **Werten**, M.W., *et al.*, *Levadura* 15 (1999) 1087-1096

WO 00/56903

WO 01/51624

15 WO 96/23064

Wu, J., **Filutowicz**, M., *Acta Biochim. Pol.* 46 (1999) 591-599

20 **Zisapel**, N., **Sokolovsky**, M., *Eur J Biochem* (1975) 54, 541-7

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína con actividad carboxipeptidasa B, que comprende los pasos de

5 (a) proporcionar un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una pre-proteína que consiste en una procarboxipeptidasa B de rata que está fusionada en N-terminal con una cola de histidinas y un péptido señal, siendo el péptido señal la secuencia N-terminal de la pre-proteína, e insertándose opcionalmente entre la cola de histidinas y el péptido señal o entre la cola de histidinas y la carboxipeptidasa B de rata una secuencia espaciadora;

10 (b) transformar un organismo microbiano huésped con el vector;

(c) cultivar el organismo microbiano huésped en un medio de cultivo que contiene nutrientes y una fuente de carbono, expresando el organismo microbiano huésped la pre-proteína y secretándose la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina al medio de cultivo;

15 (d) inmovilizar la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina secretada al medio de cultivo del paso (c) en una matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados capaz de unir la cola de histidinas, y lavar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, inmovilizándose la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina;

20 (e) incubar la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados con la pro-carboxipeptidasa B con colas de histidina inmovilizada del paso (d) en un tampón que contiene tripsina, escindiéndose así proteolíticamente la porción pro-carboxipeptidasa B y liberándose la proteína con actividad carboxipeptidasa B a la fase líquida, mientras la porción propéptido con colas de histidina está inmovilizada;

25 (f) separar la fase líquida que contiene la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la matriz de afinidad por los quelatos metálicos particulados, en la que está inmovilizada la porción propéptido con colas de histidina; y

(g) purificar la proteína con actividad carboxipeptidasa B de la fase líquida del paso (f).

30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que la cepa microbiana huésped es una cepa de levadura metilotrófica.

35 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que se **caracteriza** por que la secuencia de aminoácidos de la pro-carboxipeptidasa B de rata es la secuencia de aminoácidos desde la posición 14 a la posición 415 del Id. de Sec. N°: 3.

40 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se **caracteriza** por que el péptido señal contiene una secuencia señal de escisión de una peptidasa que está localizada adyacente a la cola de histidinas o adyacente a la secuencia espaciadora.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se **caracteriza** por que la secuencia de aminoácidos de la pre-proteína expresada es la secuencia de aminoácidos del Id. de Sec. N°: 4.

45 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se **caracteriza** por que la secuencia de nucleótidos que codifica la pro-carboxipeptidasa B de rata es la secuencia de nucleótidos desde la posición 286 a la posición 1.497 del Id. de Sec. N°: 3.

50 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se **caracteriza** por que la secuencia de nucleótidos que codifica la pre-proteína es la secuencia de nucleótidos del Id. de Sec. N°: 3.

55

60

65

Figura 2a

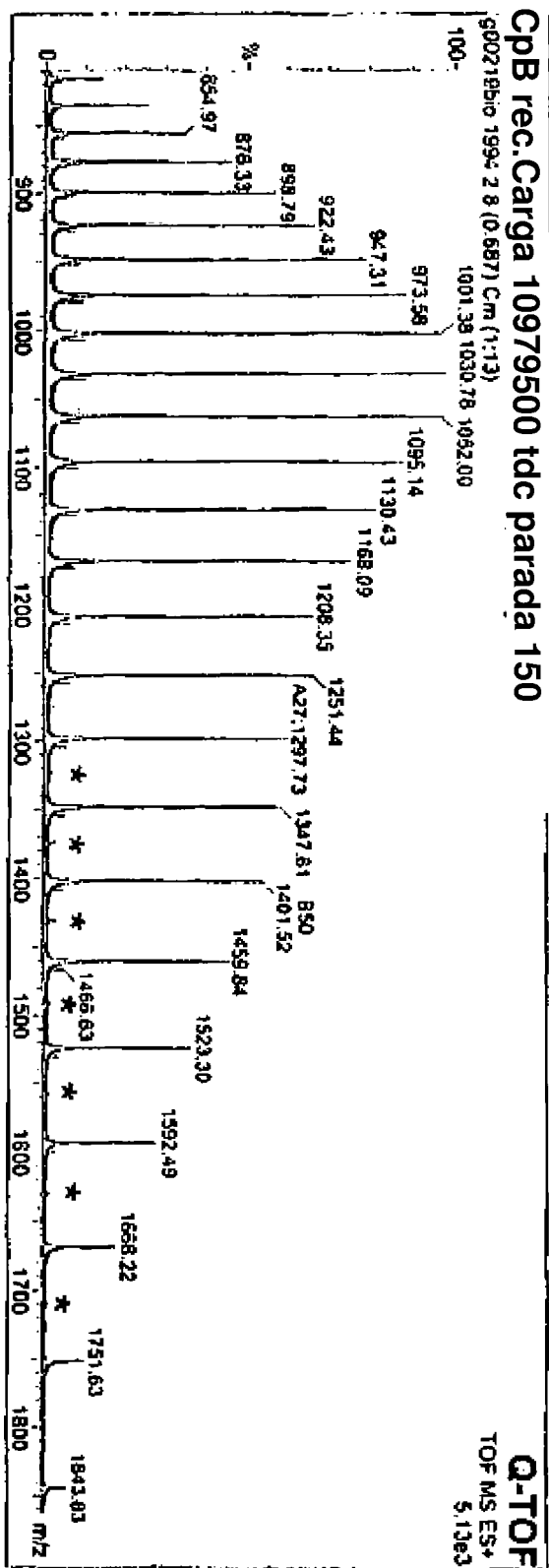


Figura 2b

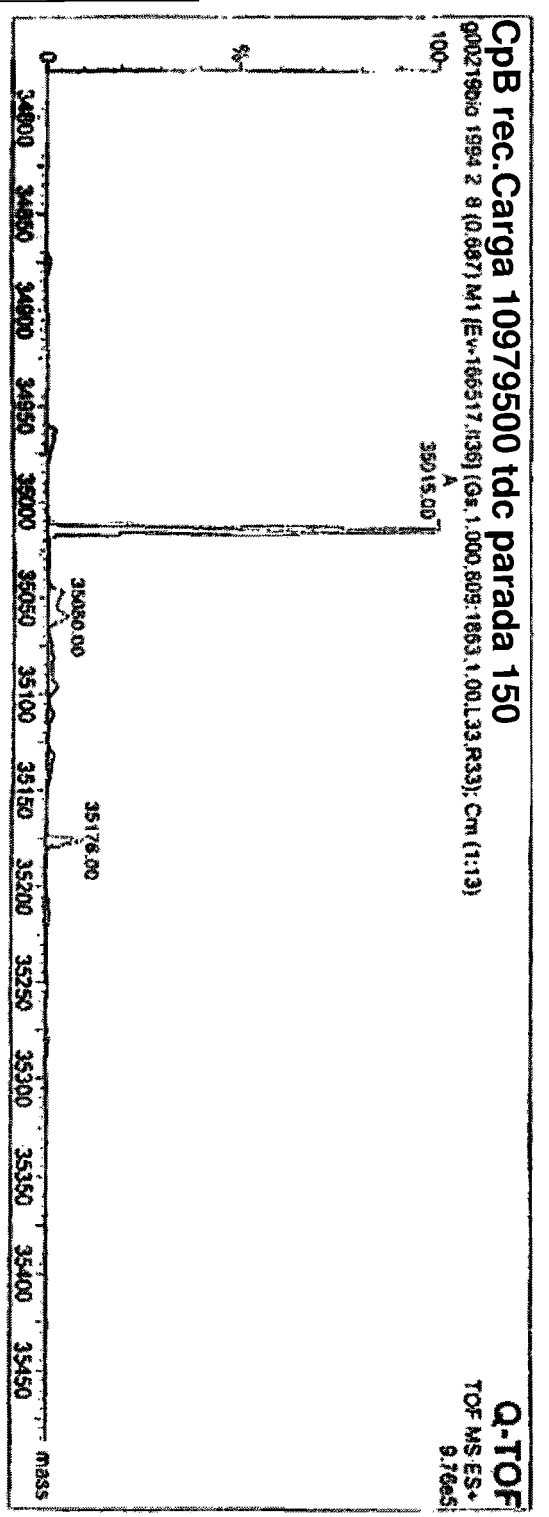


Figura 3

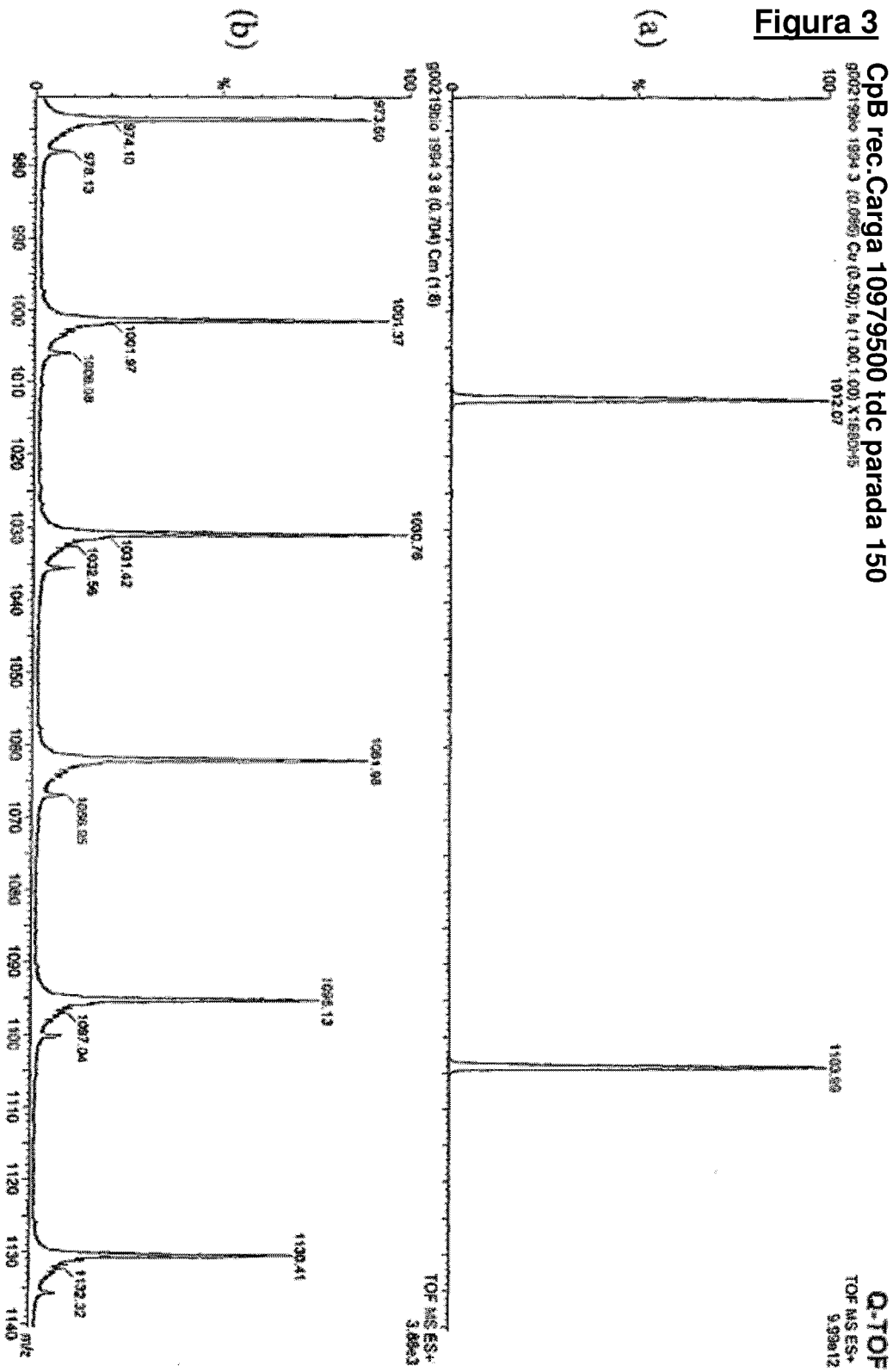


Figura 4

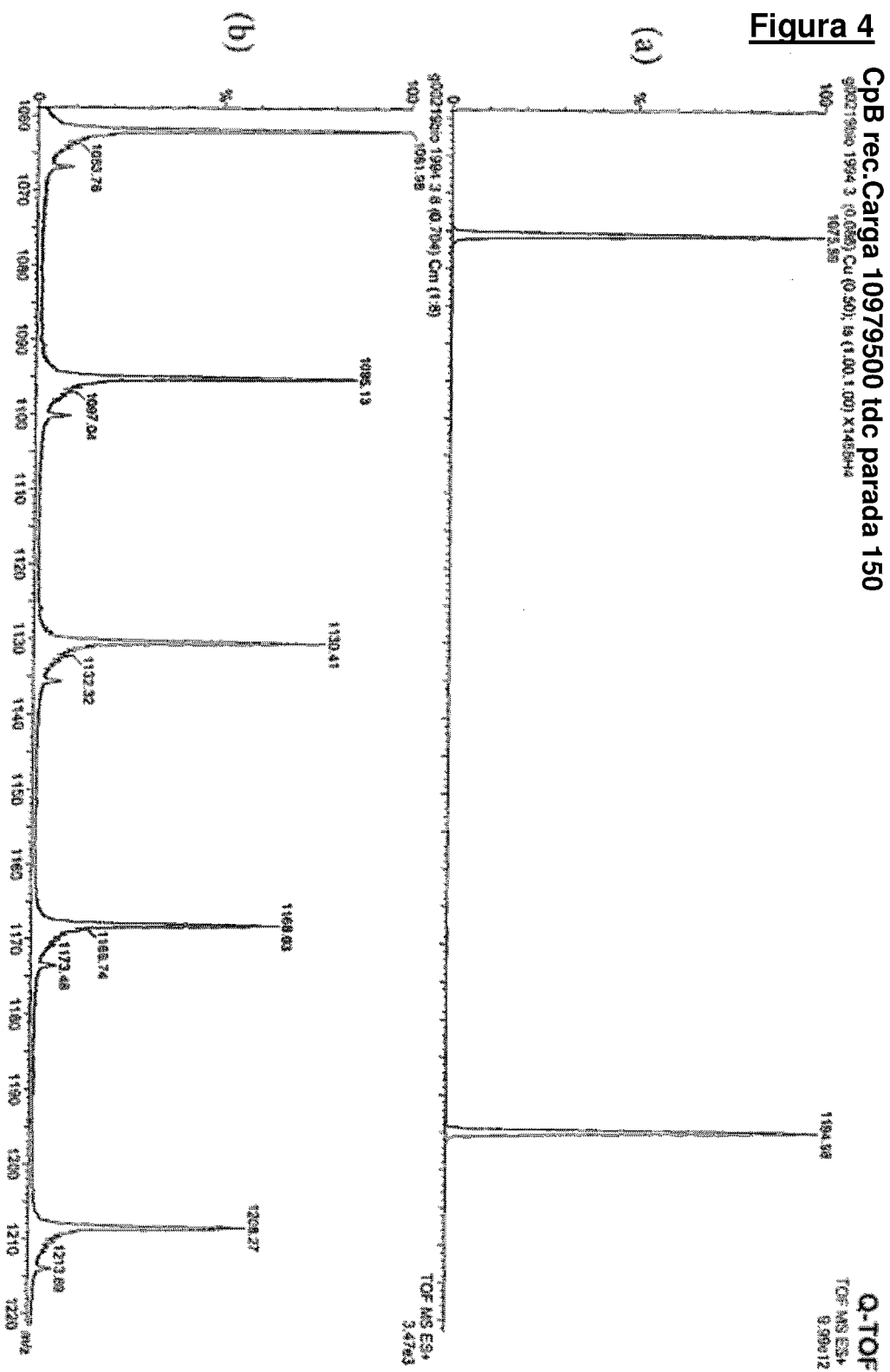


Figura 5

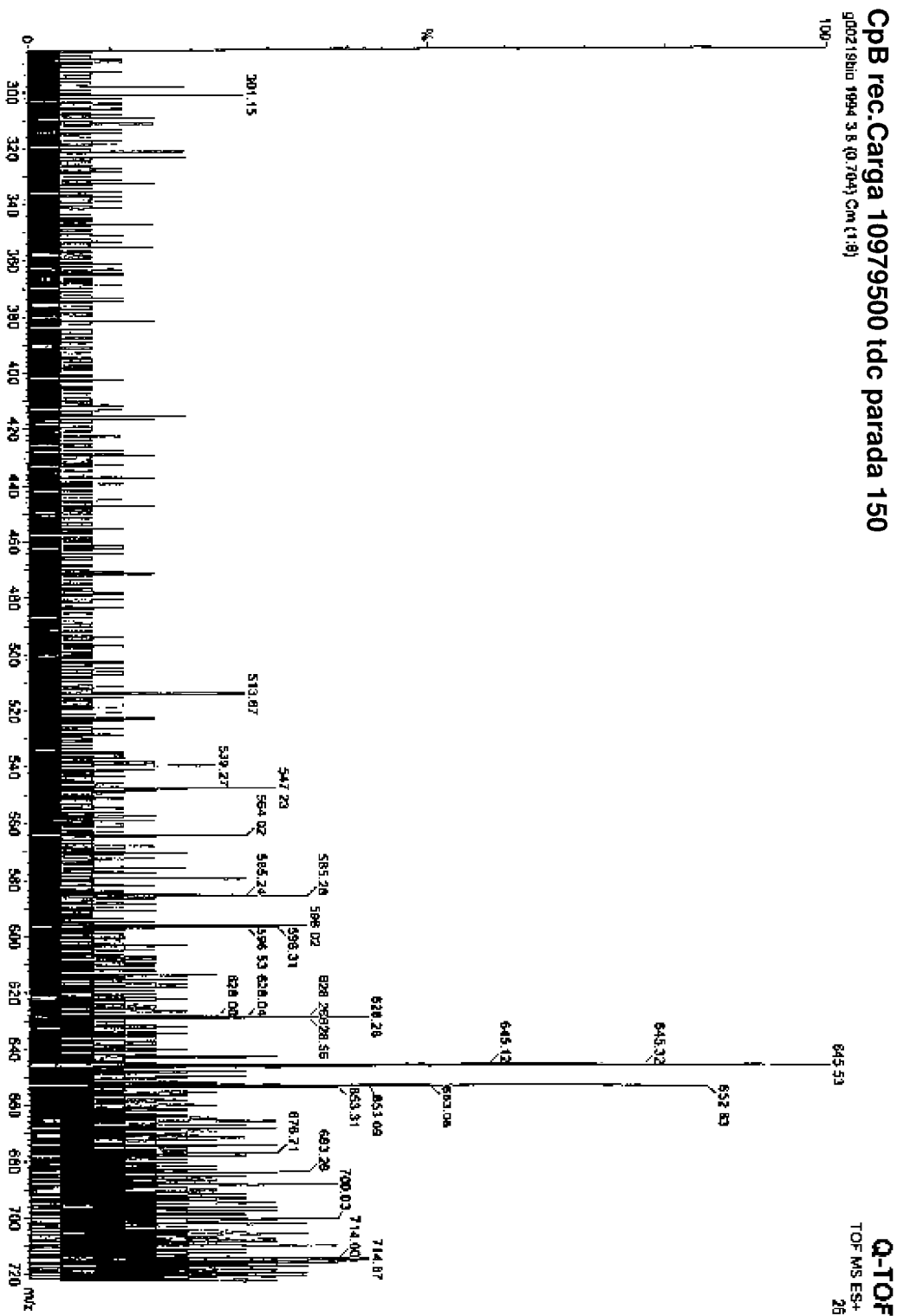


Figura 6

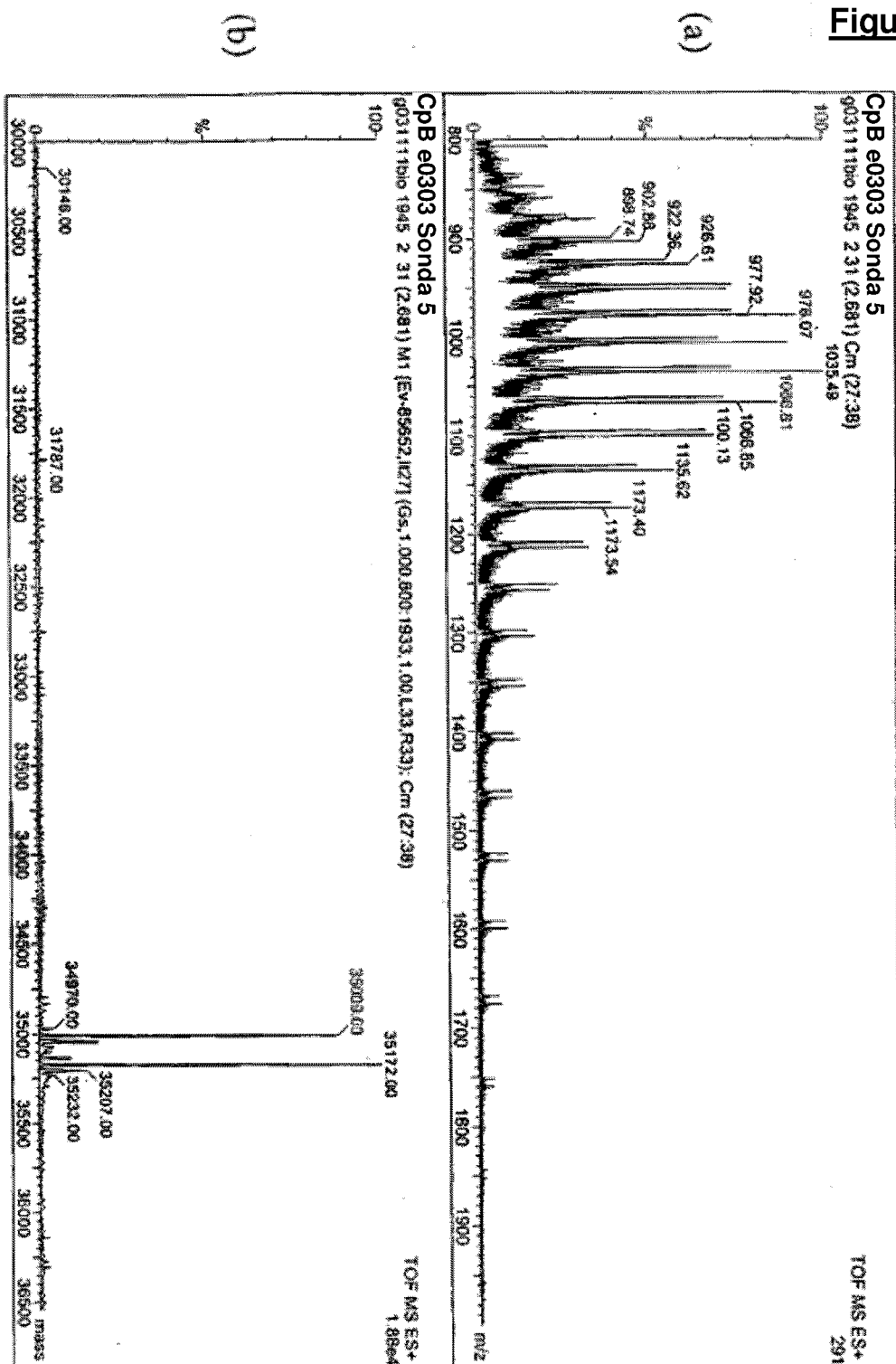


Figura 7

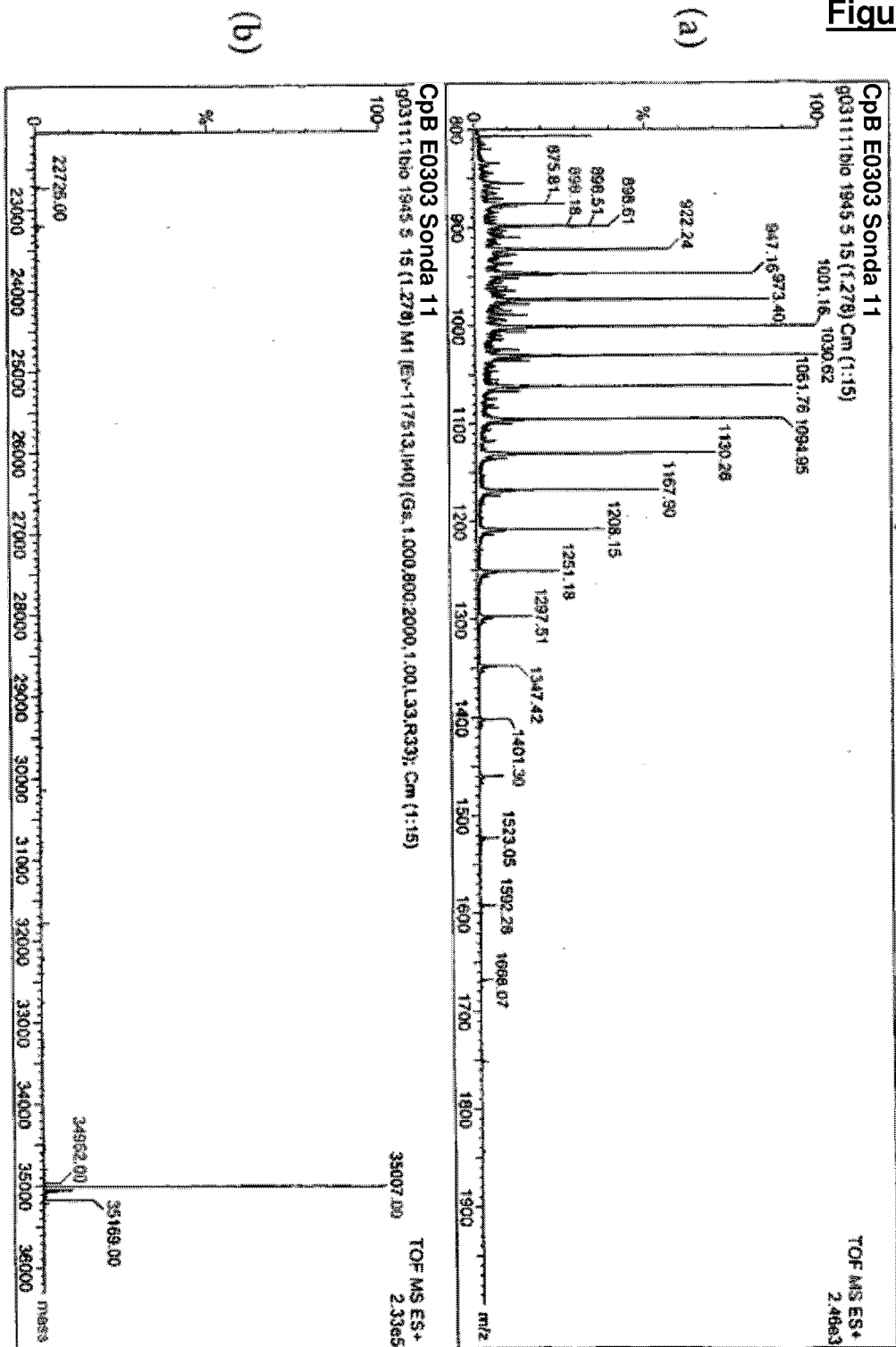
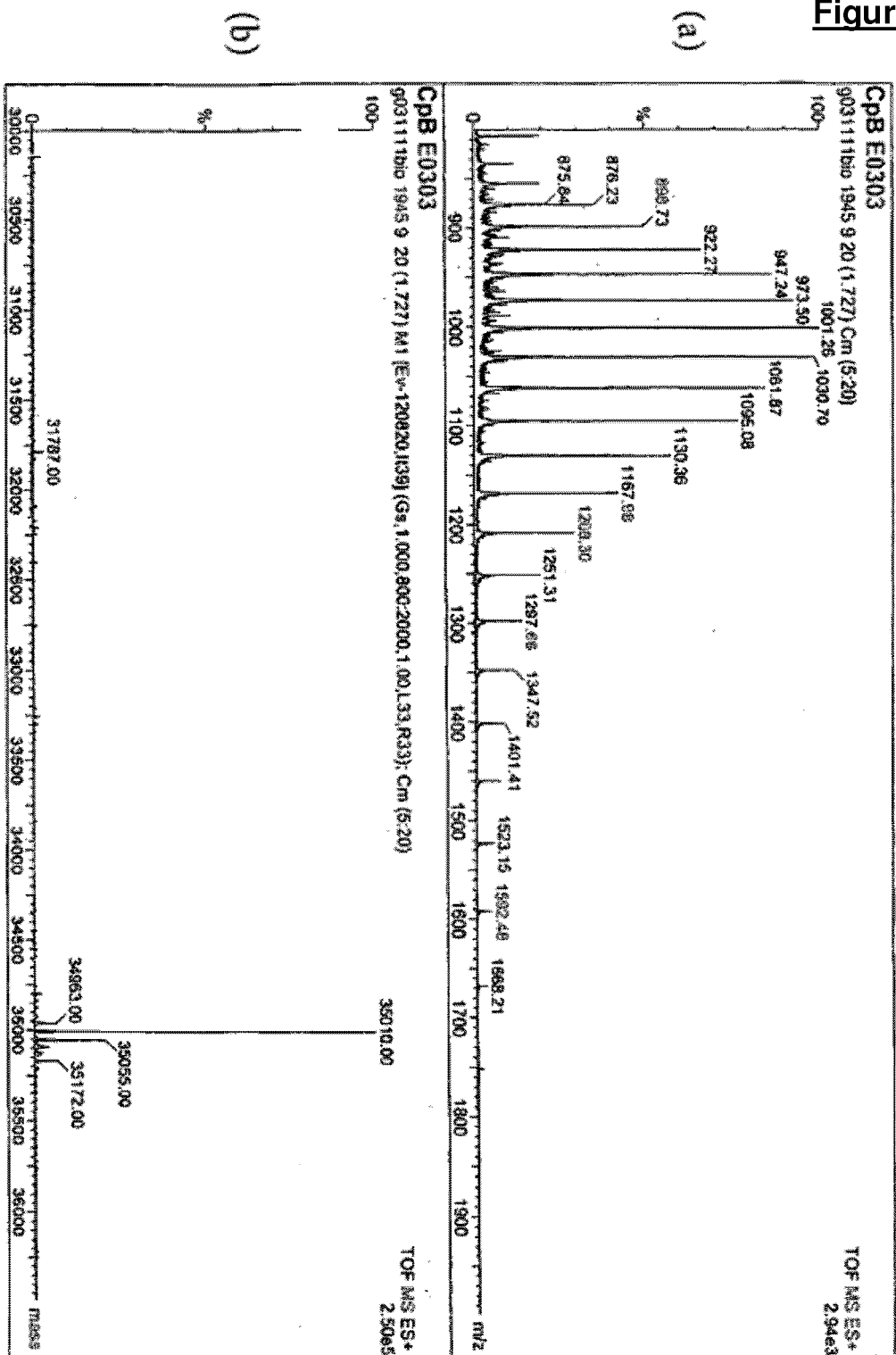


Figura 8



ES 2 337 684 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
5 <120> Carboxipeptidasa B recombinante y su purificación
<130> 22225
<150> PE 03028101.8
<151> 2003-12-05
10 <160> 5
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 1248
15 <212> DNA
<213> *Rattus norvegicus*
<220>
20 <221> Característica miscelánea
<223> Carboxipeptidasa B1 (Cpbl) de *Rattus norvegicus*, secuencia que codifica la pre-pro-enzima de acuerdo con Clauser, E. *et al* (1988) J. Biol. Chem. 263 (33), 17837-17845
<220>
25 <221> CDS
<222> (1)..(1248)
<223> Secuencia codificante que incluye el codón de parada
<220>
30 <221> Péptido señal
<222> (1)..(39)
<223> Porción que codifica para el péptido señal
35 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (40)..(1248)
<223> Porción que codifica la pro-carboxipeptidasa B (zimógeno)
40 <220>
<221> Característica miscelánea
<222> (325)..(1248)
45 <223> Fragmento que codifica la carboxipeptidasa B activa

50

55

60

65

ES 2 337 684 T3

<400> 1

5	atg ttg ctg cta ctg gcc ctg gtg agt gtg gcc ttg gct cat gct tcc Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ser Val Ala Leu Ala His Ala Ser 1 5 10 15	48
10	gag gag cac ttt gat ggc aac cgg gtg tac cgt gtc agt gca cat ggt Glu Glu His Phe Asp Gly Asn Arg Val Tyr Arg Val Ser Val His Gly 20 25 30	96
15	gaa gat cac gtc aac tta att cag gag cta gcc aac acc aaa gag att Glu Asp His Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Asn Thr Lys Glu Ile 35 40 45	144
20	gat ttc tgg aaa cca gat tct got aca caa gtg aag cct ctc act aca Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Ala Thr Gln Val Lys Pro Leu Thr Thr 50 55 60	192
25	gtt gac ttt cat gtt aaa gca gaa gat gtt gct gat gtg gag aac ttt Val Asp Phe His Val Lys Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Glu Asn Phe 65 70 75 80	240
30	ctg gag gag aat gaa gtt cac tat gag gta ctg ata agc aac gtg aga Leu Glu Glu Asn Glu Val His Tyr Glu Val Leu Ile Ser Asn Val Arg 85 90 95	288
35	aat gct ctg gaa tcc cag ttt gat agc cac acc cgt gca agt gga cac Asn Ala Leu Glu Ser Gln Phe Asp Ser His Thr Arg Ala Ser Gly His 100 105 110	336
40	agc tac acc aag tac aac aag tgg gaa acg att gag gag tgg att caa Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Ile Gln 115 120 125	384
45	caa gtt gcc act gat aat cca gac ctt gtc act cag agc gtc att gga Gln Val Ala Thr Asp Asn Pro Asp Leu Val Thr Gln Ser Val Ile Gly 130 135 140	432
50	acc aca ttt gaa gga cgt aac atg tat gtc ctc aag att ggc aaa act Thr Thr Phe Glu Gly Arg Asn Met Tyr Val Leu Lys Ile Gly Lys Thr 145 150 155 160	480

ES 2 337 684 T3

aga ccg aat aag cct gcc atc ttc atc gat tgt ggt ttc cat gca aga 528
 Arg Pro Asn Lys Pro Ala Ile Phe Ile Asp Cys Gly Phe His Ala Arg
 165 170 175

5 gag tgg att tct cct gca ttc tgt cag tgg ttt gtg aga gag gct gtc 576
 Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val
 180 185 190

10 cgt acc tat aat caa gag atc cac atg aaa cag ctt cta gat gaa ctg 624
 Arg Thr Tyr Asn Gln Glu Ile His Met Lys Gln Leu Leu Asp Glu Leu
 195 200 205

15 gat ttc tat gtt ctg cct gtg gtc aac att gat ggc tat gtc tac acc 672
 Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Val Asn Ile Asp Gly Tyr Val Tyr Thr
 210 215 220

20 tgg act aag gac aga atg tgg aga aaa acc cgc tct act atg gct gga 720
 Trp Thr Lys Asp Arg Met Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr Met Ala Gly
 225 230 235 240

25 agt tcc tgc ttg ggt gta aga ccc aac agg aat ttt aat gct ggc tgg 768
 Ser Ser Cys Leu Gly Val Arg Pro Asn Arg Asn Phe Asn Ala Gly Trp
 245 250 255

30 cgt gaa gtg gga gct tct cgg agt ccc tgc tct gaa act tac tgt gga 816
 Cys Glu Val Gly Ala Ser Arg Ser Pro Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly
 260 265 270

35 cca gcc cca gag tct gaa aaa gag aca aag gcc ctg gca gat ttc atc 864
 Pro Ala Pro Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile
 275 280 285

40 cca cag atg atg ctg tac cct tac tcc tat gac tac aaa ctg cct gag 960
 Ser Gln Met Met Leu Tyr Pro Tyr Ser Tyr Asp Tyr Lys Leu Pro Glu
 305 310 315 320

45 aac tat gag gaa ttg aat gcc ctg gtg aaa ggt gcg gca aag gag ctt 1008
 Asn Tyr Glu Glu Leu Asn Ala Leu Val Lys Gly Ala Ala Lys Glu Leu
 325 330 335

50 gcc act ctg cat ggc acc aag tac aca tat ggc cca gga gct aca aca 1056
 Ala Thr Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr
 340 345 350

55 atc tat cct gct gct ggg gga tct gac gac tgg tct tat gat cag gga 1104
 Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ser Tyr Asp Gln Gly
 355 360 365

60 atc aaa tat tca ttt acc ttt gaa ccc cgg gat aca ggc ttc ttt ggc 1152
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Phe Phe Gly
 370 375 380

65 ttt ctg ctt cct gag tct cag atc cgc cag acc tgt gag gag aca atg 1200
 Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Gln Thr Cys Glu Glu Thr Met
 385 390 395 400

ctt gca gtc aag tac att gcc aat tat gtc cga gaa cat cta tat tag 1248
 Leu Ala Val Lys Tyr Ile Ala Asn Tyr Val Arg Glu His Leu Tyr
 405 410 415

ES 2 337 684 T3

<210> 2

<211> 415

<212> PRT

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 2

```

10      Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ser Val Ala Leu Ala His Ala Ser
      1              5              10              15

15      Glu Glu His Phe Asp Gly Asn Arg Val Tyr Arg Val Ser Val His Gly
              20              25              30

20      Glu Asp His Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Asn Thr Lys Glu Ile
              35              40              45

25      Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Ala Thr Gln Val Lys Pro Leu Thr Thr
              50              55              60

30      Val Asp Phe His Val Lys Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Glu Asn Phe
      65              70              75              80

35      Leu Glu Glu Asn Glu Val His Tyr Glu Val Leu Ile Ser Asn Val Arg
              85              90              95

40      Asn Ala Leu Glu Ser Gln Phe Asp Ser His Thr Arg Ala Ser Gly His
              100              105              110

45      Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Ile Gln
              115              120              125

50      Gln Val Ala Thr Asp Asn Pro Asp Leu Val Thr Gln Ser Val Ile Gly
              130              135              140

55      Thr Thr Phe Glu Gly Arg Asn Met Tyr Val Leu Lys Ile Gly Lys Thr
      145              150              155              160

60      Arg Pro Asn Lys Pro Ala Ile Phe Ile Asp Cys Gly Phe His Ala Arg
              165              170              175

65      Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val
              180              185              190

70      Arg Thr Tyr Asn Gln Glu Ile His Met Lys Gln Leu Leu Asp Glu Leu
              195              200              205

```

ES 2 337 684 T3

Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Val Asn Ile Asp Gly Tyr Val Tyr Thr
 210 215 220
 Trp Thr Lys Asp Arg Met Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr Met Ala Gly
 5 225 230 235 240
 Ser Ser Cys Leu Gly Val Arg Pro Asn Arg Asn Phe Asn Ala Gly Trp
 10 245 250 255
 Cys Glu Val Gly Ala Ser Arg Ser Pro Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly
 15 260 265 270
 Pro Ala Pro Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile
 20 275 280 285
 Arg Asn Asn Leu Ser Thr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr
 25 290 295 300
 Ser Gln Met Met Leu Tyr Pro Tyr Ser Tyr Asp Tyr Lys Leu Pro Glu
 30 305 310 315 320
 Asn Tyr Glu Glu Leu Asn Ala Leu Val Lys Gly Ala Ala Lys Glu Leu
 35 325 330 335
 Ala Thr Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr
 40 340 345 350
 Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ser Tyr Asp Gln Gly
 45 355 360 365
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Phe Phe Gly
 50 370 375 380
 Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Gln Thr Cys Glu Glu Thr Met
 385 390 395 400
 Leu Ala Val Lys Tyr Ile Ala Asn Tyr Val Arg Glu His Leu Tyr
 405 410 415

<210> 3

<211> 1497

55 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

60 <223> Secuencia artificial que codifica el polipéptido de la pre-pro-carboxipeptidasa B, optimizado para su expresión en levadura metilotrófica.

<220>

<221> CDS

65 <222> (1)..(1497)

<223> Secuencia codificante que incluye los codones de parada.

<220>

ES 2 337 684 T3

- <221> Péptido señal
 <222> (1)..(255)
 <223> Secuencia que codifica una secuencia del péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene una secuencia señal de escisión de peptidasa.
- 5 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (256)..(261)
 10 <223> Secuencia que codifica un espaciador.
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 15 <222> (262)..(288)
 <223> Secuencia que codifica la cola de histidinas RGSHHHHHH.
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 20 <222> (286)..(570)
 <223> Secuencia que codifica el propéptido de la carboxi-peptidasa B de rata; el primer codón también forma parte de la cola de histidinas. La secuencia incorpora los cambios de aminoácido Lys14Asn y Arg142Asp documentados en la WO 96/23064.
 25 <220>
 <221> Característica miscelánea
 <222> (571)..(1497)
 <223> Secuencia que codifica la porción enzima de la carboxipeptidasa B de rata
 30 <400> 3

```

35      atg aga ttt cct tea att ttt act get gtt tta ttc gca gca tcc tcc      48
      Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
      1           5           10           15

      gca tta got got cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa      96
      Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gin
      20           25           30

      att cog gct gaa gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc      144
      Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35           40           45

      gat gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg      192
      Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
      50           55           60

      ttt ata aat act act att gac agc att get gct aaa gaa gaa ggg gta      240
      Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
      65           70           75           80

      tct ctc gag aag aga tcc gct aga ggt tct cac cac cat cac cat cac      288
      Ser Leu Glu Lys Arg Ser Ala Arg Gly Ser His His His His His His
      85           90           95

      gct tct gag gag cac ttc gac ggt aac aga gtt tac aga gtt tct gtt      336
      Ala Ser Glu Glu His Phe Asp Gly Asn Arg Val Tyr Arg Val Ser Val
      100           105           110
  
```

65

ES 2 337 684 T3

cac ggt gag gac cac gtt aac ttg att caa gag ttg gct aac act aag 384
 His Gly Glu Asp His Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Asn Thr Lys
 115 120 125

5
 gag att gac ttc tgg aag cca gac tct gct act caa gtt aag cca ttg 432
 Glu Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Ala Thr Gln Val Lys Pro Leu
 130 135 140

10
 act act gtt gac ttc cac gtt aag gct gag gac gtt gcc gat gtt gaa 480
 Thr Thr Val Asp Phe His Val Lys Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Glu
 145 150 155 160

15
 aac ttc ttg gag gag aac gag gtt cac tac gaa gtt ttg atc tct aac 528
 Asn Phe Leu Glu Glu Asn Glu Val His Tyr Glu Val Leu Ile Ser Asn
 165 170 175

20
 gtt cgt aac gct ttg gaa tcc caa ttc gac tct cac act aga gct tct 576
 Val Arg Asn Ala Leu Glu Ser Gln Phe Asp Ser His Thr Arg Ala Ser
 180 185 190

25
 ggt cac tct tac act aag tac aac aac tgg gag act att gag gct tgg 624
 Gly His Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Asn Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp
 195 200 205

30
 att caa caa gtt gct act gac aac cca gac ttg gtt act caa tct gtt 672
 Ile Gln Gln Val Ala Thr Asp Asn Pro Asp Leu Val Thr Gln Ser Val
 210 215 220

35
 att ggt act act ttc gag ggt aga aac atg tac gtt ttg aag att ggt 720
 Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Asn Met Tyr Val Leu Lys Ile Gly
 225 230 235 240

40
 aag act aga cca aac aag cca gct att ttc att gac tgt ggt ttc cac 768
 Lys Thr Arg Pro Asn Lys Pro Ala Ile Phe Ile Asp Cys Gly Phe His
 245 250 255

45
 gct aga gaa tgg att tcc cca gct ttc tgt caa tgg ttc gtt aga gag 816
 Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu
 260 265 270

50
 gct gtt aga act tac aac caa gag att cac atg aag caa ttg ttg gac 864
 Ala Val Arg Thr Tyr Asn Gln Glu Ile His Met Lys Gln Leu Leu Asp
 275 280 285

55
 gag ttg gac ttc tac gtt ttg cca gtt gtt aac att gac ggt tac gtt 912
 Glu Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Val Asn Ile Asp Gly Tyr Val
 290 295 300

60
 tac act tgg act aag gac aga atg tgg aga aag act cgt tcc act atg 960
 Tyr Thr Trp Thr Lys Asp Arg Met Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr Met
 305 310 315 320

65
 gct ggt tct tct tgc ctt ggt gtc gat cca aat aga aac ttt aac gct 1008
 Ala Gly Ser Ser Cys Leu Gly Val Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asn Ala
 325 330 335

ES 2 337 684 T3

5 ggt tgg tgt gag gtc ggt gct tct aga tcc cca tgc tct gaa act tac 1056
 Gly Trp Cys Glu Val Gly Ala Ser Arg Ser Pro Cys Ser Glu Thr Tyr
 340 345 350
 10 tgt ggt cct gct cct gaa tct gaa aag gag act aag gct ttg gct gac 1104
 Cys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp
 355 360 365
 15 ttc att aga aac aac ttg tct act att aag gct tac ttg act att cac 1152
 Phe Ile Arg Asn Asn Leu Ser Thr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His
 370 375 380
 20 tct tac tct caa atg atg ttg tac cca tac tct tac gac tac aag ttg 1200
 Ser Tyr Ser Gln Met Met Leu Tyr Pro Tyr Ser Tyr Asp Tyr Lys Leu
 385 390 395 400
 25 cca gaa aac tac gag gag ttg aac gct ttg gtt aag ggt gct gct aaa 1248
 Pro Glu Asn Tyr Glu Glu Leu Asn Ala Leu Val Lys Gly Ala Ala Lys
 405 410 415
 30 gaa ttg gct act ttg cac ggt act aaa tac act tac ggt cca ggt gct 1296
 Glu Leu Ala Thr Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala
 420 425 430
 35 act act att tac cca gct gct ggt ggt tct gac gac tgg tct tac gac 1344
 Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ser Tyr Asp
 435 440 445
 40 caa ggt att aag tac tct ttc act ttc gag ttg aga gat act ggt ttc 1392
 Gln Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Phe
 450 455 460
 45 ttc ggt ttc ttg ttg cct gag tcc caa att aga caa act tgt gag gaa 1440
 Phe Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Gln Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480
 50 acc atg ttg gct gtt aag tac att gct aac tac gtt aga gag cac ttg 1488
 Thr Met Leu Ala Val Lys Tyr Ile Ala Asn Tyr Val Arg Glu His Leu
 485 490 495
 55 tac taa taa 1497
 Tyr

<210> 4

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial que codifica el polipéptido de la pre-pro-carboxipeptidasa B, optimizada para su expresión en levadura metilotrófica.

ES 2 337 684 T3

<400> 4

5 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

10 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Glu
20 25 30

15 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

20 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

25 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

30 Ser Leu Glu Lys Arg Ser Ala Arg Gly Ser His His His His His His
85 90 95

35 Ala Ser Glu Glu His Phe Asp Gly Asn Arg Val Tyr Arg Val Ser Val
100 105 110

40 His Gly Glu Asp His Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Asn Thr Lys
115 120 125

45 Glu Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Ala Thr Gln Val Lys Pro Leu
130 135 140

50 Thr Thr Val Asp Phe His Val Lys Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Glu
145 150 155 160

55 Asn Phe Leu Glu Glu Asn Glu Val His Tyr Glu Val Leu Ile Ser Asn
165 170 175

60 Val Arg Asn Ala Leu Glu Ser Gln Phe Asp Ser His Thr Arg Ala Ser
180 185 190

65 Gly His Ser Tyr Thr Lys Tyr Asn Asn Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp
195 200 205

ES 2 337 684 T3

Ile Gln Gln Val Ala Thr Asp Asn Pro Asp Leu Val Thr Gln Ser Val
 210 215 220
 5
 Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Asn Met Tyr Val Leu Lys Ile Gly
 225 230 235 240
 10
 Lys Thr Arg Pro Asn Lys Pro Ala Ile Phe Ile Asp Cys Gly Phe His
 245 250 255
 15
 Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu
 260 265 270
 20
 Ala Val Arg Thr Tyr Asn Gln Glu Ile His Met Lys Gln Leu Leu Asp
 275 280 285
 25
 Glu Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Val Asn Ile Asp Gly Tyr Val
 290 295 300
 30
 Tyr Thr Trp Thr Lys Asp Arg Met Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr Met
 305 310 315 320
 35
 Ala Gly Ser Ser Cys Leu Gly Val Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asn Ala
 325 330 335
 40
 Gly Trp Cys Glu Val Gly Ala Ser Arg Ser Pro Cys Ser Glu Thr Tyr
 340 345 350
 45
 Cys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp
 355 360 365
 50
 Phe Ile Arg Asn Asn Leu Ser Thr Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His
 370 375 380
 55
 Ser Tyr Ser Gln Met Met Leu Tyr Pro Tyr Ser Tyr Asp Tyr Lys Leu
 385 390 395 400
 60
 Pro Glu Asn Tyr Glu Glu Leu Asn Ala Leu Val Lys Gly Ala Ala Lys
 405 410 415
 65
 Glu Leu Ala Thr Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala
 420 425 430

ES 2 337 684 T3

Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly Gly Ser Asp Asp Trp Ser Tyr Asp
 435 440 445

5
 Gln Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Phe
 450 455 460

10
 Phe Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Gln Thr Cys Glu Glu
 465 470 475 480

15
 Thr Met Leu Ala Val Lys Tyr Ile Ala Asn Tyr Val Arg Glu His Leu
 485 490 495

20 Tyr

- <210> 5
- 25 <211> 938
- <212> DNA
- <213> *Pichia pastoris*
- <220>
- 30 <221> promotor
- <222> (1)..(938)
- <223> Promotor AOX de *Pichia pastoris*
- 35 <400> 5

40 agatctaaca tccaaagacg aaagggtgaa tgaaaaccttt ttgccatcog acatccacag 60
 gtocattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagacogt 120
 tgcaaacgca ggacctocac tctcttctc ctcaacaccc acttttgoca tcgaaaaacc 180
 45 agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctccattocaa ttctctctat taggctacta 240
 acaccatgac tttattagec tgtctatcct ggccccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300
 50 tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
 agtgtggggg caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420

55

60

65

ES 2 337 684 T3

gtcttgggaa ctiatatgac aaaagegtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480
 ttgaaatgct aacggccagt tggcaaaaa gaaacttcca aaagtcggca taccgtttgt 540
 5 cctgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
 ctctatcgtc tctgaacccc ggtgcaactg tgccgaaaag caaatgggga aacacccgct 660
 10 ttttggatga ttatgcattg tctcccaatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
 gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aaccctact tgacagcaat 780
 15 atataaacag aaggaagctg cctgtctta accctttttt tttatcatca ttattagctt 840
 actttcataa ttggactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
 caactgaga agatcaaaa acaactaatt attcgaaa 930
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65