



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 454**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01996597 .9**

86 Fecha de presentación : **14.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1334183**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Nuevas endoproteasas solubles para el procesamiento *in vitro* de proteínas recombinantes.**

30 Prioridad: **16.11.2000 IT MI00A2465**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2007**

73 Titular/es: **Keryos S.p.A.**  
**Via della Filanda 5**  
**20060 Gessate MI, IT**

72 Inventor/es: **Vanoni, Marco;**  
**Tortora, Paolo;**  
**Tonon, Giancarlo;**  
**Taylor, Jeffrey y**  
**Orsini, Gaetano**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 265 454 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

Nuevas endoproteasas solubles para el procesamiento *in vitro* de proteínas recombinantes.

5 La presente invención se refiere a nuevas endopeptidasas que tienen una alta especificidad de corte para usar en el procesamiento *in vitro* de proteínas recombinantes que se pueden usar en aplicaciones industriales y, más en particular, a derivados de la proteína Kex1 de *Kluyveromyces lactis* secretados solubles y a su uso, en una forma soluble o en una forma inmovilizada en un soporte orgánico o inorgánico, para la liberación de la proteína de interés a partir de proteínas de fusión.

10 **Campo de la invención**

15 La fabricación de proteínas recombinantes heterólogas en sistemas de expresión adecuados es una de las aplicaciones principales de interés industrial de la tecnología de ADN recombinante. Debido a la inestabilidad del péptido/proteína en la célula hospedante, a menudo es ventajoso fabricar el péptido/proteína de interés en forma de una proteína de fusión que comprende una proteína protectora (o estabilizante) la cual posteriormente será procesada en un sitio predeterminado específico con el fin de liberar la proteína o péptido deseados.

20 Ese procedimiento también permite obtener la proteína o péptido deseados sin la extensión de un resto de metionina N-terminal que constituye el primer resto de aminoácido de las proteínas expresadas en sistemas bacterianos. Las proteínas de fusión también se fabrican con el objetivo de aumentar los niveles de expresión o de facilitar el procedimiento de purificación por la selección de secuencias de polipéptidos adecuadas, en los extremos amino y carboxi terminales a los cuales se une la proteína de interés.

25 El éxito de esta estrategia requiere la disponibilidad de reactivos químicos o enzimáticos, que puedan realizar el procesamiento de la proteína de fusión con el nivel deseado de especificidad, de ser posible sin la liberación de ningún producto secundario, para así reducir el coste del procesamiento corriente abajo. De los procedimientos químicos propuestos, se puede mencionar el corte en los restos de metionina con CNBr, la hidrólisis ácida en el dipéptido Asn-Pro o el corte con hidroxilamina en el dipéptido Asn-Gly (Fontana y col.; Practical protein chemistry. A handbook., 30 pág. 5569-575, 1986). Los procedimientos enzimáticos usan, por ejemplo, lisil-endopeptidasas (proteasa I de *Achromobacter*) que cortan específicamente el enlace peptídico del extremo carboxilo de la lisina, y la proteasa V8 de *Staphylococcus* que corta específicamente el enlace peptídico del extremo carboxilo del ácido glutámico (publicación de patente japonesa examinada publicada nº 6-87788). Sin embargo, debido a que estos procedimientos químicos y las endoproteasas reconocen un solo resto de aminoácido, es necesario que el resto de aminoácido no esté presente en el 35 péptido deseado con el fin de permitir la escisión eficaz del péptido deseado de la proteína quimérica; así pues, los péptidos que se pueden fabricar son limitados. Por lo tanto, diferentes estudios se han dirigido a la búsqueda para y/o al diseño de proteasas que tienen una especificidad de sustrato adecuada para usar en el corte proteolítico específico *in vitro* de proteínas recombinantes de interés industrial. Se han usado otras endoproteasas que tienen una secuencia de corte que es más restringida, es decir, que cubre una secuencia de aminoácidos, y no un solo resto, e incluyen, por 40 ejemplo, trombina, factor Xa y enteroquinasa (Nilsson y col., *Current Opinion Struct. Biol.* 2, 569-575, 1992).

Más recientemente, se ha centrado un considerable interés en algunos miembros de la familia de las subtilasas, o serina proteasas, cuyos miembros más conocidos son: (1) subtilisinas bacterianas, (2) la proteasa Kex2 de *S. cerevisiae*, (3) furina y proteínas análogas a la furina. En particular, aunque las subtilisinas bacterianas no presentan una 45 especificidad de corte suficiente para el procesamiento *in vitro* de proteínas de fusión, excepto en variantes diseñadas de forma adecuada (Ballinger y col., *Biochemistry* 35, 13579-13585, 1996; patente de EE.UU. 5.837.516), tanto la proteína Kex2 como las furinas presentan una especificidad de corte adecuada para este propósito. Las subtilasas que tienen una especificidad de corte alta, que se denominarán en lo sucesivo con la expresión proteasas análogas a kexino, tienen la función molecular/fisiológica de "convertasas de prohormonas"; es decir, son enzimas que producen 50 hormonas peptídicas a partir de sus precursores *in vivo*, por corte proteolítico en el extremo C-terminal de pares de los restos de bases Lys-Arg o Arg-Arg. La Fig. 1 muestra en un diagrama la estructura de proteasas análogas a kexino. El dominio catalítico análogo a la subtilisina que se extiende en aproximadamente 330 aminoácidos es altamente conservado entre las convertasas de proproteínas eucarióticas. En particular, los restos del sitio activo que constituye la tríada catalítica (Ser-His-Asp) y un resto de Asn que estabiliza la cavidad oxaniónica en el estado de transición, 55 están presentes en las posiciones correspondientes en todos los miembros, excepto en PC2, en el que el resto Asn está sustituido por un resto Asp (Bryan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 3743-3745, 1986).

Las secuencias que flanquean estos restos también son muy conservadas. Además, la región de 140 aminoácidos que sigue al dominio catalítico, conocido como dominio "Homo B", "P" o "medio", también es muy conservado entre 60 las convertasas eucarióticas, incluyendo la proteasa de levadura Kex2, pero está ausente en las subtilisinas bacterianas. El dominio *Homo B* es esencial para la actividad catalítica (Zhong y col., *FEBS Lett.*, 396:31-36, 1996). El dominio contiene una secuencia Arg-Gly-Asp conservada que se parece a la secuencia de reconocimiento de las integrinas. La mutación de uno de estos tres restos en PC1/PC3 produce la pérdida de actividad catalítica y la dirección incorrecta de esta convertasa neuroendocrina hacia la ruta de secreción constitutiva (Lusson y col., *Biochem. J.*, 326: 737-744, 65 1997). Otra región conservada es el pro-péptido, que se elimina autocatalíticamente por procesamiento del sitio Arg-Xaa-Lys-Arg durante la maduración de las convertasas. Hacia el extremo C-terminal, la furina, PACE4, PC5/PC6A y B tienen un dominio rico en Cys, que está bien conservado y cuya función hasta ahora ha sido desconocida. La furina Kex2, PC5/PC6B y LPC/PC7/PC8/SPC7 también tienen un dominio transmembranal cerca del extremo C-terminal.

La endoproteasa Kex2 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue la primera enzima mostrada, cuyas pruebas genéticas y bioquímicas han permitido atribuirle la función de procesamiento de proproteínas en sitios de di-bases en el retículo *trans*-Golgi.

5 El gen *KEX2* codifica una glicoproteína de 814 restos de aminoácidos con una masa molecular de 100 a 120 kDa. Esta glicoproteína está unida a las membranas del retículo *trans*-Golgi y tiene la función fisiológica de procesar el factor  $\alpha$  y la toxina asesina. La proteína Kex2 es una serina proteasa dependiente de calcio que corta específicamente los enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de las secuencias Lys-Arg, Arg-Arg y Pro-Arg (Mizuno y col., *Biochem Biophys. Res. Comm.* 144: 807-814, 1987). La secuencia de aminoácidos de Kex2 en la parte de NH<sub>2</sub>-terminal contiene  
10 un dominio pre-pro que tiene potenciales sitios autoproteolíticos (Lys<sub>79</sub>-Arg<sub>80</sub>, Pro<sub>102</sub>-Arg<sub>103</sub> y Lys<sub>108</sub>-Arg<sub>109</sub>) seguido de una región (144-438 aa) que tiene un alto grado de homología de secuencia (identidad del 30%) con las subtilasas bacterianas (Mizuno y col., *Biochem Biophys. Res. Comm.* 156: 246-254, 1988; Fuller y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1434-1438, 1989). La proteasa Kex2 es expresada en las células *MAT $\alpha$*  de la levadura *S. cerevisiae* como un precursor inactivo y la región NH<sub>2</sub>-terminal de la forma madura es generada por procesamiento proteolítico en  
15 el sitio Lys<sub>108</sub>-Arg<sub>109</sub>, seguido de corte proteolítico de los dipéptidos Leu-Pro y Val-Pro por la enzima dipeptidil-aminopeptidasa Ste13 (Brenner y Fuller, *Proc. Natl. Sci. USA*, 89:922-926, 1992).

La proteasa Kex2 catalíticamente activa de *S. cerevisiae* se purificó de la levadura en forma de una enzima soluble secretada (ss-Kex2) generada por la inserción de un codón de parada antes del dominio transmembranal COOH-terminal. Esta modificación facilitaba la purificación de la enzima. Los estudios sobre la especificidad del sustrato de la proteasa ss-Kex2 de *S. cerevisiae* purificada, han demostrado que la proteasa no excluye ningún resto en la posición P3, excepto Asp y Pro, pero por otra parte, es selectivo para los aminoácidos en la posición P2 y P1. En particular Kex2 en la posición P2 excluiría los aminoácidos que tienen cadenas voluminosas, pero sin embargo, reconocería las que tienen restos cargados positivamente, mientras que en la posición P1, la endoproteasa Kex2 es extremadamente  
25 selectiva para la carga y para la estructura de la arginina. El documento EP-32377 describe proteasas Kex2 de *S. cerevisiae* que no tienen la región hidrófoba C-terminal; estas proteasas son solubles en agua y pueden ser secretadas fuera de la célula, dejando sin alterar la actividad enzimática de la proteína nativa.

### Descripción detallada de la invención

30 Algunas cepas de *Kluyveromyces lactis* presentan un fenotipo asesino que secreta una toxina capaz de asesinar células sensibles de diferentes especies de levaduras. Esta propiedad asesina se debe a la presencia de dos plásmidos de ADN lineal, pGKL1 y pGKL2, que cooperan para producir la toxina, y un componente que permite su inmunidad. Se aisló una mutación (*kex1*) en un solo locus del cromosoma de *K. lactis*, llamado *KEX1*, cuya mutación conduce a la  
35 pérdida del fenotipo asesino, mientras que permite que se mantengan los plásmidos mencionados.

Se encontró que el gen *KEX1* clonado por complementación genética de la mutación anterior, era ortólogo al gen *KEX2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas codificadas por los genes *KEX2* de *S. cerevisiae* y *KEX1* de *K. lactis* tienen un grado alto de homología de secuencia (identidad > 50%), y cada una de ellas es capaz de compensar la  
40 deficiencia de la otra. Esta información sugiere que el gen *KEX1* de *Kluyveromyces lactis* (Weslowski-Louvel y col., *Yeast* 4: 71-81, 1988) también codifica una proteasa que tiene especificidad de corte para los residuos de dibases y que está implicado en la producción de la forma madura de la toxina asesina generada por procesamiento de su precursor. Sin embargo, hasta ahora no se han tenido datos disponibles relacionados con la expresión del producto del gen *KEX1*, ni tampoco se ha tenido ningún dato disponible relativo a la caracterización bioquímica y enzimática de esta proteína.

Ahora se ha encontrado que las proteasas Kex1 recombinantes de *K. lactis*, que constituyen el objetivo principal de la presente invención, no tienen el dominio transmembranal (y se denominarán con el término ss-Kex1), y manifiestan actividad catalítica de endopeptidasa *in vitro* respecto a sustratos que contienen los restos Pro-Arg y los restos de  
50 dibases, en particular, respecto a los restos Arg-Arg, Lys-Arg. Sorprendentemente también se ha encontrado que las proteasas Kex1 recombinantes cuya secuencia de proteínas, excepto por las deleciones que comprenden el dominio de unión a la membrana (posiblemente excepto por las deleciones que comprenden el dominio de unión a la membrana), corresponde a la codificada por el gen *KEX1* de *K. lactis*, demuestran una estabilidad térmica sustancialmente mayor comparadas con las proteínas de la misma familia, cuya secuencia de proteína corresponde a la codificada por el gen  
55 *KEX2* de *S. cerevisiae*, y por lo tanto se pueden usar en procedimientos de proteólisis dirigida *in vitro* en condiciones en las que otras proteínas de la familia kexina, en particular Kex2 de *S. cerevisiae*, son inactivadas.

De acuerdo con la presente invención las proteasas Kex1 solubles se caracterizan por una estabilidad mayor comparadas con las correspondientes variantes codificadas por el gen *KEX2* de *S. cerevisiae*, manteniendo las proteasas Kex1 solubles más de 50% de su actividad en condiciones en las que la proteína Kex2 está completamente inactivada.  
60

Como podrá observarse a partir de lo siguiente, en las endoproteasas Kex1 solubles de acuerdo con la presente invención, la deleción del dominio transmembranal se logra eliminando al menos 57 restos aminoácidos del extremo C-terminal de la enzima codificada por el gen *KEX1* de *K. lactis*; la secuencia génica usada experimentalmente es la disponible del banco de datos EMBL con el número de acceso X07038.  
65

En particular, la endoproteasa Kex1 soluble de acuerdo con la realización preferida de la presente invención, se caracteriza por tener la secuencia ID SEC n° 2, o en cualquier caso por tener una secuencia con una homología de 90%, preferiblemente una homología de 95% con respecto a la ID SEC n° 2.

## ES 2 265 454 T3

La presente invención está representada por una molécula de ADN que codifica una endoproteasa Kex1 soluble, en la que se han eliminado al menos 57 y no más de 100 restos de aminoácido del extremo C-terminal.

De acuerdo con una realización preferida dicha molécula de ADN se caracteriza porque (a) tiene una secuencia ID SEC nº 1, (b) tiene una secuencia que hibrida con la ID SEC nº 1, (c) tiene una secuencia que es degenerada como resultado del código genético respecto al ADN que tiene la secuencia ID SEC nº 1, y/o (d) tiene una secuencia con una homología de 90%, preferiblemente una homología de 95%, con respecto a la ID SEC nº 1.

Un objetivo adicional de la invención lo constituye un procedimiento para fabricar una sustancia biológicamente activa de interés (un péptido o una proteína), que comprende:

(a) la producción de un polipéptido o proteína de fusión que comprenden la secuencia del péptido o proteína de interés en una construcción de tipo NH<sub>2</sub>-A-B-C-COOH, en la que NH<sub>2</sub> es el extremo NH<sub>2</sub>-terminal del polipéptido o proteína de fusión, A es cualquier proteína o polipéptido deseado (opcionalmente sólo la metionina codificada por el codón de iniciación de la traducción), B es un fragmento "conector" de unión que termina con una secuencia de aminoácidos reconocida por la endoproteasa Kex1 de la presente invención, C representa el polipéptido o proteína de interés, de modo que el primer aminoácido de la proteína madura de interés está inmediatamente en el extremo carboxilo de la secuencia reconocida por la endopeptidasa Kex1 de acuerdo con la presente invención y COOH representa el extremo carboxi-terminal del polipéptido o proteína de fusión;

(b) la incubación *in vitro* del polipéptido o proteína de fusión mencionados en la etapa (a) anterior en presencia de una endoproteasa Kex1 de acuerdo con la presente invención, con el fin de separar la proteína o polipéptido de interés de la pareja de fusión y con el extremo NH<sub>2</sub>-terminal libre correspondiente al extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína o polipéptido de interés;

(c) la separación y purificación del péptido o proteína biológicamente activos de interés.

Los procedimientos para llevar a cabo las operaciones (a), (b) y (c) listadas antes son conocidas en la técnica, y por lo tanto no es necesario explicarlas con detalle; están descritas, por ejemplo, en los documentos EP-327377, EP-794254, EP-794255 y US-5.077.204, cuyo contenido debe considerarse como una parte integrante de la presente descripción.

Las endoproteasas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para procesar proteínas de fusión que contienen péptidos o proteínas de interés industrial y/o terapéutico; las posibles proteínas que se pueden obtener usando el procedimiento de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, proteínas recombinantes para uso terapéutico, tales como, por ejemplo, hormonas peptídicas, interleucinas, interferones, citocinas, factores de crecimiento, enzimas fibrinolíticas y enzimas recombinantes de interés industrial que se pueden usar como biocatalizadores, tales como, por ejemplo, lipasas, hidrolasas, nucleasas, oxidasas, fosfatasas.

Otros objetivos de la invención están representados por las secuencias de ADN que codifican las proteasas mencionadas antes, por los correspondientes plásmidos de expresión y por las células hospedantes que las contienen.

La proteasa Kex1 de *Kluyveromyces lactis* de acuerdo con la presente invención se obtuvo haciendo expresar variantes de la proteasa Kex1 que no tienen el dominio de unión a la membrana, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La secreción en el medio de crecimiento de las proteasas ss-Kex1 se logró mediante la región pre-pro homóloga o mediante la región pre-pro de la proteína Kex2 homóloga de *S. cerevisiae*, así como gracias a la secuencia (pre) señal de la glucoamilasa de la variante diastaticus de *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a estos estudios, se encontró sorprendentemente que los dominios catalíticos de Kex1 y Kex2 tienen diferencias funcionales, como se demuestra por la observación de que la proteína Kex1 que termina en el resto 580 es catalíticamente inactiva, a diferencia de la proteína Kex2 que termina en el resto 593, que es el resto correspondiente en la proteína Kex2 (Gluschankof y col., *EMBO J.*, 13: 2280-2288, 1994). También se buscaron condiciones de crecimiento más adecuadas para la producción y secreción de la proteasa en un matraz.

Las Kex1 solubles se purificaron del medio de crecimiento y se determinaron algunas de sus propiedades bioquímicas, incluyendo la eficacia de corte en sustratos modelo y la estabilidad y actividad catalítica en presencia de diferentes agentes físico-químicos, tales como la temperatura.

La proteasa ss-KEX1 así obtenida se puede usar como tal o se puede inmovilizar en una matriz orgánica o inorgánica insolubles; las proteasas así inmovilizadas se pueden volver a usar varias veces en el procesamiento *in vitro* de las proteínas de fusión de interés industrial, con ventajas evidentes.

La estabilidad térmica de las nuevas endopeptidasas ss-Kex1 secretadas solubles es tal, que mantienen aproximadamente 60% o más de su actividad original después de incubación a 50°C durante 6 minutos, en cuyas condiciones las correspondientes proteínas Kex2 pierden su actividad completamente.

La masa molecular calculada de las nuevas endopeptidasas ss-Kex1 de la presente invención es aproximadamente de 65 a 70 kDa (enzima producida a partir de la cepa NP31) y de 70 a 80 kDa (enzima producida a partir de la cepa NP168) determinado por SDS-PAGE después de calentamiento y reducción de la muestra.

En lo sucesivo la invención se explicará con ejemplos específicos. Los ejemplos tienen el único propósito de clarificar la invención, aunque se debe indicar que la invención no está limitada de ninguna forma por los mismos.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la organización estructural en dominios de la proteína Kex2, un miembro típico representativo y el primero identificado de la familia de las subtilasas de procesamiento análogos a kexino.

La Figura 2 muestra el alineamiento de las secuencias de proteína de Kex2 de *S. cerevisiae* y Kex1 de *K. lactis*.

La Figura 3 muestra la estabilidad térmica de las proteasas ss-Kex2 de *S. cerevisiae* y ss-Kex1 de *K. lactis*.

La Figura 4 muestra el perfil de actividad como una función de la temperatura de las proteasas ss-Kex2 de *S. cerevisiae* y ss-Kex1 de *K. lactis*.

La Figura 5 muestra el perfil de elución en RP-HPLC de una preparación purificada de una proteasa ss-Kex1 soluble de la presente invención.

La Figura 6 muestra las cinéticas de digestión *in vitro* de una proteína de fusión obtenida con una proteasa ss-Kex1 soluble de la presente invención.

La Figura 7 muestra el perfil de digestión *in vitro* de una proteína de fusión obtenida con una proteasa ss-Kex1 inmovilizada de la presente invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### *Construcción de plásmidos para la expresión de Kex1 a partir de Kluyveromyces lactis y Saccharomyces cerevisiae*

Salvo que se indique lo contrario, se usaron procedimientos convencionales para todas las manipulaciones estándar del ADN recombinante. Se da un conjunto de estos procedimientos, por ejemplo, en Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning.

Con el fin de construir plásmidos para la expresión en *S. cerevisiae* de variantes truncadas de la región COOH-terminal de la proteasa Kex1 de *K. lactis*, controlado con diferentes secuencias señal, se llevó a cabo la PCR con oligonucleótidos mutágenos adecuados, siguiendo procedimientos de subclonación estándar. Los vectores de expresión usados en esta invención eran pEMBLyex4 (Baldari y col., *EMBO J.*, 6: 229-234, 1987), pVTU (Vernet y col., *Gene* 52: 225-233, 1987) y YEPSTA (Martegani y col., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 604-608, 1992). Los plásmidos que expresan las kexinas a partir de estos derivados están listados en la Tabla 1. Basándose en la información dada en esta Tabla, los expertos en la técnica podrán construir los plásmidos mencionados son excesiva experimentación. En esta patente, se hace referencia a las siguientes secuencias de proteínas y ácidos nucleicos: (gen *KEX1*, número de acceso de EMBL X07038; proteína Kex1, número de acceso de Swiss-Prot 09231; gen *KEX2* número de acceso M22870; proteína Kex2, número de acceso de Swiss-Prot P13134). En el siguiente ensayo, el nucleótido 1 se refiere al nucleótido adenina (A) que corresponde al codón de iniciación de la traducción (ATG) de cada gen dado que codifica proteasas; igualmente, el aminoácido 1 se refiere a la metionina codificada por dicho codón de iniciación. De forma análoga a la descripción dada antes para Kex2, las formas maduras solubles y enzimáticamente activas de Kex1 descritas en la presente invención se expresan inicialmente en forma de pre-pro-proteínas inactivas que posteriormente son procesadas en el sitio de Lys101-Arg-102 (cuando se usa la pro-proteína homóloga) o en el sitio de Lys-113-Arg-114 (cuando se usa la pro-proteína Kex2). Para los propósitos de la presente invención, las formas maduras solubles y enzimáticamente activas de Kex1 se caracterizan porque tienen una cadena de polipéptido entre el aminoácido 103 y el aminoácido 643 de la secuencia dada en la Figura 2 y se indican por la terminología ss-Kex1-Cx, en la que x representa el resto de aminoácido de la secuencia de la Figura 2 que constituye el resto carboxi-terminal de las formas solubles de Kex1. Simplemente a modo de ejemplo, se da con detalle la construcción del plásmido PL24 que expresa la proteasa Kex1-C600. Puesto que se conocen las secuencias de ADN, la construcción de estos plásmidos está dentro de la competencia habitual de un experto en la técnica, y también se puede llevar a cabo mediante estrategias y técnicas que difieren de las ejemplificadas, pero que son equivalentes en términos de obtener el o los productos esperados.

Con el fin de construir el plásmido para la expresión de Kex1-C6000 truncado en el aminoácido 600, cuyo resto corresponde al aminoácido 613 en la proteína Kex2 codificada por el gen *KEX2* de *S. cerevisiae*, se amplificó la secuencia que codifica los restos 1-600 de Kex1 mediante la PCR con los oligonucleótidos indicados a continuación (los nucleótidos que constituyen los sitios de restricción para BamHI y HindIII están subrayados):

5'CGC GGA TCC ATG ATC C TA TCG TCG CAG C3'

5'C CCC AAG CTT TCA TTC AGC ATC CTC TTT GTC3'

Al final de la PCR, el fragmento amplificado se sometió a restricción con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III, se purificó en gel de agarosa después de electroforesis preparativa, y se subclonó en el vector de expresión pEMBLyex4 que se había linearizado previamente con *Bam*HI y *Hind*III, permitiendo así obtener el plásmido pL24 que permite que la proteína Kex1-C600 sea expresada en la levadura con control del promotor híbrido inducible *GAL1-10-CYC1*.

TABLA 1

*Plásmidos usados en esta invención que expresan diferentes formas de Kex1*

Plásmido	Marca-dor (es)	Origen	Promo-tor	Pre	Pro	ss-Kex1-Cx
PL24	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C600
PL57	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C579
PL58	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C580
PL98	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C611
PL99	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C622
PL86	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C640
PL87	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C643
PL120	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex2 <sub>28-114</sub>	Kex1-C600
PL68	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C600
PL22	<i>URA3, leu2d</i>	YE <sub>p</sub> STA	<i>GAL10-CYC1</i>	Sta2 <sub>1-22</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C600
PL132	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex2 <sub>28-114</sub>	Kex1-C611
PL133	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex2 <sub>28-114</sub>	Kex1-C640
PL134	<i>URA3, leu2d</i>	pEMBLyex4	<i>GAL10-CYC1</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex2 <sub>28-114</sub>	Kex1-C643
PL135	<i>URA3</i>	PVTU	<i>TDH3</i>	Kex1 <sub>1-24</sub>	Kex1 <sub>25-102</sub>	Kex1-C600
PL144	<i>URA3</i>	pVTU	<i>TDH3</i>	Kex2 <sub>1-27</sub>	Kex2 <sub>28-114</sub>	Kex1-C600

## Ejemplo 2

*Expresión y secreción de la proteína Kex1 de Kluyveromyces lactis en Saccharomyces cerevisiae*

Se transformaron diferentes cepas de *S. cerevisiae* usando las construcciones descritas antes con el fin de obtener la expresión de las formas secretadas catalíticamente activas y solubles de la proteasa Kex1 de *K. lactis* GRF18\* (*MAT $\alpha$  his 3-11, 15 leu 2-3, 112 ura3*); X4004 (*MAT $\alpha$  lys5 met2 ura3 trp1*); MVY4935 (*MAT $\alpha$  sta10 leu2 ura3 arg4 his3 lys2*); W303 1-a (*MAT $\alpha$  leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2*). El procedimiento de transformación usado es el descrito por Schiestl y Gietz (1989) *Curr. Genet.* 16: 339-246. Los matracos usados para el crecimiento de la levadura en medio líquido se incubaron en un baño con termostato de Dubnoff y se agitaron continuamente. El crecimiento en una placa se llevó a cabo en incubadoras adecuadas en una atmósfera húmeda. Para

## ES 2 265 454 T3

la metodología respecto a la levadura, dondequiera que no se describa de forma explícita, se debe hacer referencia a C. Guthrie y G.R. Fink, *Methods in Enzymology* 194.

Las células transformadas se cultivaron en placa en medio mínimo selectivo (YNB), con glucosa como fuente de carbón, y se incubaron a 30°C. En estas condiciones, las células diseñadas crecen sin producir la proteína de interés. Los sistemas de expresión basados en los vectores análogos a pEMBLyex4 se pueden inducir con galactosa, porque la proteína de interés se pone bajo el control del promotor híbrido inducible GAL-CYC, y la presencia de glucosa en el medio de cultivo provoca un estado de represión de la expresión. Este sistema prevé el uso de rafinosa como la fuente de carbón para permitir la desrepresión, y el uso de galactosa con el fin de asegurar el estado de inducción. Además, el sistema de expresión basado en vectores análogos a pEMBLyex4 provisto del marcador selectivo *leu2d* proporciona la posibilidad de una amplificación adicional del número de copias del plásmido de interés, recurriendo, cuando el genotipo de la cepa transformada lo permite, a la selección en medio mínimo sin leucina.

Las cepas transformadas se hicieron crecer en los siguientes medios de cultivo:

Medio rico en YP: fuente de carbón 20 g/l; peptona 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l.

Medio mínimo YNB-aa: fuente de carbón 20 g/l; YNB sin aminoácidos 6,7 g/l.

Medio estándar 1040: YNB sin aminoácidos y sin sulfato amónico 1,7 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,32 g/l; NH<sub>4</sub>Cl 5,0 g/l; BIS-TRIS 8,37 g/l; fuente de carbón 20 g/l; L-triptófano 0,12 g/l; Adenina-HCl 0,24 g/l; casaminoácidos 5,0 g/l. Cuando fue necesario los medios se solidificaron con agar al 2%. Se añaden bases de nucleótidos y aminoácidos a 50 mg/l.

El medio de cultivo de estas cepas transformadas se sometió a la medición de la actividad para probar la presencia de una forma secretada catalíticamente activa de la proteasa de interés. La actividad enzimática se determinó con un ensayo colorimétrico que aprovecha la capacidad de la enzima para hidrolizar el sustrato de Z-L-tirosina-L-lisina-L-arginina-p-nitroanilida (Z-Y-K-R-pNA). La mezcla de incubación comprende Z-Y-K-R-pNA 0,1 mM en Hepes 0,2 M, pH 7,0 y CaCl<sub>2</sub> 1 mM, en un volumen total de 1,5 ml a 37°C. La reacción se sigue a 405 nm, longitud de onda a la cual se produce la disminución máxima del coeficiente de extinción molar ( $\Delta\epsilon$ ), igual a 10,9 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Se define una unidad de enzima como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto en las condiciones descritas antes. Salvo que se indique expresamente lo contrario, los datos presentados en la Tabla 2 se refieren a la actividad secretada en el medio de crecimiento por derivados de la cepa W303 que se hizo crecer en un matraz a 30°C, con agitación (220 rpm), en medio 1040-galactosa al 2% (excepto para las cepas NP225 y NP265 en las que la fuente de carbón añadida al medio de crecimiento era glucosa al 2%). Se tomaron varias muestras a lo largo de la curva de crecimiento para cada cepa. La tabla 2 da la actividad máxima medida para cada cepa transformada. Como puede verse, se observan buenos niveles de secreción tanto cuando la expresión de Kex1 es guiada por el promotor *GAL10-CYC1* como cuando se usa el promotor de la alcohol deshidrogenasa. Por lo tanto, la invención no está limitada por el tipo de promotor usado, siempre que los niveles de secreción de la endoproteasa de la invención sean satisfactorios.

TABLA 2

*Actividad máxima de Kex1 secretada en el medio de crecimiento en un matraz por cepas de S. cerevisiae transformadas con plásmidos que expresan diferentes formas de la proteasa Kex1 de K. lactis*

Nombre de la cepa transformada	Plásmido de expresión	Actividad (mU/ml)
NP31	PL 24	1300
NP113	PL57	No detectable
NP115	PL 58	No detectable
NP180	PL98	960
NP183	PL99	1260
NP166	PL86	1250
NP168	PL87	1200
NP231	PL120	1230
NP157	PL68	700

## ES 2 265 454 T3

TABLA 2 (continuación)

	Nombre de la cepa transformada	Plasmido de expresión	Actividad (mU/ml)
5	NP33	PL22	<120
	NP250	PL132	1300
10	NP251	PL133	1250
	NP252	PL134	1280
	NP255	PL135	1290
15	NP265	PL144	1270

Se encontró que la sustitución de la secuencia pre-pro de Kex1 por la de Kex2 daba como resultado una proteína que era secretada en el medio de crecimiento tan bien como la proteína Kex1 que usa su propia secuencia pre-pro. Al contrario, la sustitución sólo de la secuencia pre (secuencia señal) por la secuencia señal de la glucoamilasa codificada por el gen *STA2* de la variedad *diastaticus* (cepa NP33) de *Saccharomyces cerevisiae* o la secuencia señal de Kex2 (cepa NP157) daba como resultado una menor secreción de la proteína Kex1. Por consiguiente, en los experimentos descritos en los siguientes Ejemplos, se usó la proteína cuya secreción era guiada por la secuencia pre-pro de Kex1 o Kex2 (cepas NP31 y NP231, respectivamente).

Sorprendentemente se encontró que la cepa NP115, que expresa una Kex1 que termina en el aminoácido 580, no presenta actividad enzimática detectable. Este resultado contrasta con el mantenimiento de la actividad enzimática en la parte de la proteína Kex2 que termina en el aminoácido 593, es decir, el aminoácido de Kex2 que corresponde al aminoácido 580 de Kex1 de *K. lactis* (Gluschankof y col., véase antes, véase también la Figura 2 para las alineamientos). Este resultado significa que a pesar del alto nivel de homología, las proteínas Kex1 de *K. lactis* y Kex2 de *S. cerevisiae* difieren considerablemente entre sí, de modo que no se pueden considerar como equivalentes en todos los aspectos relacionados con las realizaciones de esta invención. En relación con esto, también se debe tener en cuenta los datos de estabilidad térmica y los perfiles de actividad en función de la temperatura comparativos, que se dan en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Comparadas con la proteína presente en la cepa NP31, las cepas NP180, NP183, NP166 y NP168 tienen extensiones carboxi-terminales que pueden cubrir el dominio entero rico en serina/treonina, parando inmediatamente antes del dominio transmembranal. Comparada con la cepa NP31 no se observan diferencias significativas en la actividad de Kex1 secretada en el medio de crecimiento por las cepas mencionadas antes.

### 40 Ejemplo 3

*Purificación de la proteína Kex1 de Kluyveromyces lactis segregada en el medio de crecimiento por cepas de Saccharomyces cerevisiae transformadas de forma adecuada*

La purificación de la variante suprimida de la proteasa Kex1 de *K. lactis* ss-Kex1-C600 se llevó a cabo partiendo de las cepas transformadas de *S. cerevisiae* hechas crecer en un matraz o en un fermentador hasta la fase exponencial final. En ambos casos, el medio se separó de las células por centrifugación, se filtró sobre un filtro que tenía poros de 5  $\mu$ m y después se concentró aproximadamente 10 veces y se dializó frente a una solución de Triton X-100 al 0,1%, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, por ultrafiltración en una membrana con corte de exclusión de 10 kDa. La solución de diálisis se purificó en una columna de resina de SP-Sefarosa preequilibrada con un tampón de acetato sódico pH 5,2, y se eluyó mediante un gradiente lineal de pH en tampón de tris-acetato. Las fracciones que contenían actividad enzimática de Kex1 se introdujeron en una columna de resina de Q-Sefarosa preequilibrada con tampón de bis-tris-acetato y se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl. La mezcla de las fracciones que contenían actividad enzimática de Kex1 se analizó por RP-HPLC. Los análisis por RP-HPLC se llevaron a cabo usando una columna Vydac-C18, 2,1 x 250 mm, a una temperatura de 55°C y con detección UV a una longitud de onda de 215 nm; la elución se llevó a cabo con un flujo de 0,21 ml/minuto empezando con las fases móviles A (ácido trifluoroacético al 0,1% en agua) y B (ácido trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo), con un gradiente lineal de 37% a 87% de fase móvil B en 21 minutos. Los análisis demostraron la presencia de un pico homogéneo con una pureza mayor de 95% (Figura 5) y una actividad específica de aproximadamente 100 U/mg.

### 60 Ejemplo 4

*Caracterización de la proteína Kex1 de Kluyveromyces lactis*

Se determinaron las constantes cinéticas por un procedimiento simplificado que requiere que las mediciones se lleven a cabo con una sola concentración inicial de sustrato y hasta que el sustrato se agote. El procedimiento permite que se determinen los valores medios de concentración residual y velocidad en diferentes tiempos, y se puede aplicar en los casos en los que la enzima cataliza una reacción completamente irreversible en las condiciones de trabajo, y no

## ES 2 265 454 T3

está sometida a la inhibición por el producto (Segel, I.H. (1975) *Enzyme Kinetics*, Wiley, Nueva York). Los resultados así obtenidos se procesaron usando el programa Grafit, que permite la interpolación del perfil de Michaelis-Menten y la determinación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , presentados en la Tabla 3. Después se obtuvieron  $k_{cat}$  y la relación  $k_{cat}/K_m$  a partir de estos valores y a partir de la concentración de enzima. Los resultados muestran que las dos proteasas ss-Kex1 y ss-Kex2 no difieren significativamente en sus propiedades cinéticas.

TABLA 3

*Constantes cinéticas de las endoproteasas ss-Kex2-C613 y ss-Kex1-C600*

	$V_{max}$ ( $\Delta A \text{ min}^{-1}$ ) $\times 10^3$	$K_m$ $\mu\text{M}$	$k_{cat}$ $\text{min}^{-1}$	$k_{cat}/K_m$ $\mu\text{M}^{-1} \times \text{min}^{-1}$
ss-Kex1-C600	1720	61,4	$1,84 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
ss-Kex2-C613	1029	56,8	$1,37 \times 10^5$	$12,4 \times 10^3$

De las características principales de una enzima que son necesarias para la aplicación industrial como biocatalizador, una de las más importantes sin duda es la estabilidad en las condiciones de trabajo. Por lo tanto se observará que es necesario investigar y caracterizar las dos proteasas también desde este punto de vista. Inicialmente se determinó el perfil de la inactivación térmica de las dos enzimas a diferentes temperaturas en ausencia de cualquier agente estabilizante. El perfil se obtuvo incubando la enzima a la temperatura predeterminada, tomando muestras en tiempos sucesivos y determinando la actividad enzimática residual en las muestras. Así se determina la disminución de la actividad en función del tiempo, actividad que se supone que es proporcional a la concentración de la enzima activa.

Los perfiles de inactivación de las dos proteasas se realizaron a temperaturas de 10 a 50°C. Los datos se dan en la Figura 3, y muestran que, sorprendentemente, la proteasa ss-Kex1 tiene una estabilidad térmica significativamente mayor que la de la proteasa ss-Kex2: a modo de ejemplo, esta última era casi completamente inactiva después de 6 h de incubación a 50°C, mientras que en las mismas condiciones, Kex1 mantenía no menos del 50% de su actividad. Los perfiles de inactivación de la proteasa Kex1 a 60° y 70°C, y por comparación, los de Kex2 a 50°C, también muestran la diferencia sustancial de termoestabilidad entre las dos moléculas: está claro que la proteasa ss-Kex1 es aproximadamente tan estable a 70°C como la proteínasa ss-Kex2 a 50°C. Cuando se administraron ss-Kex1 y ss-Kex2 en condiciones estándar, con concentraciones de saturación del sustrato y midiendo la velocidad media en los primeros 5 minutos de la reacción, la proteína Kex1 presentó una temperatura de funcionamiento óptima a aproximadamente 70°C, mientras que en las mismas condiciones, la temperatura de trabajo óptima aparente de la endopeptidasa Kex2 era aproximadamente 50°C (Figura 4).

### Ejemplo 5

*Uso de la proteína Kex1 de Kluyveromyces lactis en el procesamiento de proteínas de fusión*

Se estudió el procesamiento de proteínas de fusión usando, como modelo de proteína, una fusión entre una secuencia peptídica de 35 aminoácidos que lleva el dipéptido Lys-Arg en el extremo carboxi-terminal y la secuencia de 191 restos de aminoácidos de la hormona de crecimiento humano (h-GH). La proteína de fusión, que tiene una estructura (parte peptídica)-(Lys-Arg)-(h-GH), se ha expresado en una cepa transformada de *E. coli*, se ha extraído y purificado hasta un grado de pureza mayor que 70%. La hidrólisis de la proteína de fusión (1 gramo/litro) se llevó a cabo para un periodo total de 18 horas, en tampón a pH 7 que contenía  $\text{Ca}^{2+}$  4 mM, a una temperatura de 30°C y usando una preparación de ss-Kex1<sub>600</sub> $\Delta\text{C}$  purificada de 0,2 mg/ml. El avance de la reacción se siguió por análisis por RP-HPLC que mostró un rendimiento de la reacción mayor que 95% (Figura 6); la especificidad de la hidrólisis se comprobó por análisis de la secuencia  $\text{NH}_2$ -terminal del producto de reacción que dio la secuencia esperada para h-GH. Se obtuvieron resultados similares cuando h-GH se fusionó con polipéptidos de diferente longitud (de 20 a 300 restos de aminoácidos).

### Ejemplo 6

*Inmovilización de la proteasa Kex1 y su uso en el procesamiento de proteínas de fusión*

La proteasa ss-Kex1 se inmovilizó usando, como soporte sólido inorgánico, la resina Eupergit C250L, cuyos grupos epoxi actúan como grupos reactivos para la formación de enlaces covalentes con los grupos amino, tiol o hidroxilo de la enzima. Esto reduce la flexibilidad estructural de la enzima y por lo tanto debería promover su estabilización. La mezcla de incubación comprende 789  $\mu\text{g}$  de enzima en tampón de fosfato potásico 1 M, pH 7,0, en presencia de 8 mg de resina Eupergit C250L, en un volumen total de 55  $\mu\text{l}$  a temperatura ambiente durante 4 días, sin agitación. Al final del periodo de incubación, la enzima inmovilizada se somete a operaciones de lavado sucesivas con el tampón de dosificación Hepes 0,2 M pH 7,0 +  $\text{CaCl}_2$  1 mM, y se conserva a 4°C en presencia de una solución de Hepes 0,2 M, pH 7,0,  $\text{CaCl}_2$  1 mM/glicerol al 60%.

## ES 2 265 454 T3

La proteína inmovilizada Kex1 se usó en el procesamiento de una proteína de fusión PNP<sub>20aa</sub>-hGH, incubando esta última a 37°C con una relación de 10:1 respecto a la enzima inmovilizada. En estas condiciones, el procesamiento de la proteína se continuó durante un periodo de 10 minutos a 15 horas por SDS-PAGE. Después de 6 horas de incubación, se obtiene una digestión igual a aproximadamente 60% de la proteína fusionada y después de 15 horas se obtiene una digestión casi completa (Figura 7). El uso posterior otra vez de la misma preparación de proteasa Kex1 inmovilizada en las mismas condiciones de trabajo condujo a un resultado sustancialmente idéntico al resultado previo, demostrando así, que en las condiciones adoptadas, la proteasa Kex1 inmovilizada no pierde actividad de forma apreciable después incluso de 30 horas de incubación a 37°C, y se puede volver a usar en la liberación de la proteína de interés de la pareja de fusión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una endoproteasa Kex1 soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *KEX1* de *Kluyveromyces lactis* (número de acceso de EMBL X07038) y sin dominio transmembranal, en la que se han eliminado al menos 57 y no más de 100 restos de aminoácidos del extremo C-terminal.
- 10 2. Una endoproteasa Kex1 soluble de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** por tener la secuencia ID SEC nº 2 o por tener una secuencia con una homología del 90%, preferiblemente una homología del 95% con respecto a la ID SEC nº 2.
3. ADN que codifica una endoproteasa Kex1 soluble de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 4. ADN de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque (a) tiene una secuencia ID SEC nº 1, (b) tiene una secuencia que hibrida con la ID SEC nº 1, (c) tiene una secuencia que es degenerada como resultado del código genético respecto al ADN que tiene la secuencia ID SEC nº 1, y/o (d) tiene una secuencia con una homología del 90%, preferiblemente una homología del 95%, con respecto a la ID SEC nº 1.
- 20 5. Un vector de expresión plasmídico que comprende ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.
6. Células hospedantes transformadas por un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
- 25 7. Células hospedantes de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizadas** porque son células de levaduras.
8. Células hospedantes de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizadas** porque son células de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30 9. Un procedimiento para fabricar un péptido o proteína que comprende: (a) la producción de un polipéptido o proteína de fusión que comprende la secuencia del péptido o proteína de interés, y que tiene en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal del péptido o proteína de interés una secuencia de aminoácidos que contiene un sitio dipeptídico hidrolizable por la endoproteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2; (b) la incubación *in vitro* del polipéptido o proteína de fusión mencionados en la etapa (a) anterior, en presencia de una endoproteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2; (c) la separación y purificación del péptido o proteína de interés.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque el sitio dipeptídico hidrolizable es Lys-Arg, Arg-Arg o Pro-Arg.
- 40 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque el péptido o proteína se seleccionan de proteínas recombinantes para uso terapéutico, tales como por ejemplo, hormonas peptídicas, interleucinas, interferones, citocinas, factores de crecimiento, enzimas fibrinolíticas y enzimas recombinantes de interés industrial que se pueden usar como biocatalizadores, tales como por ejemplo, lipasas, hidrolasas, nucleasas, oxidasas, fosfatasas.
- 45 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** porque la endoproteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, se inmoviliza en un soporte orgánico o inorgánico insoluble.
- 50
- 55
- 60
- 65

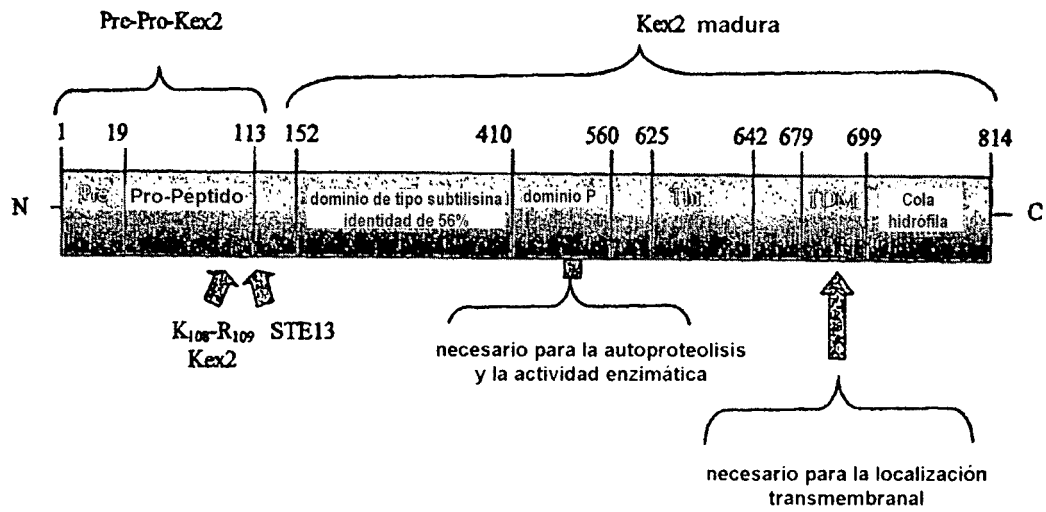


Figura 1



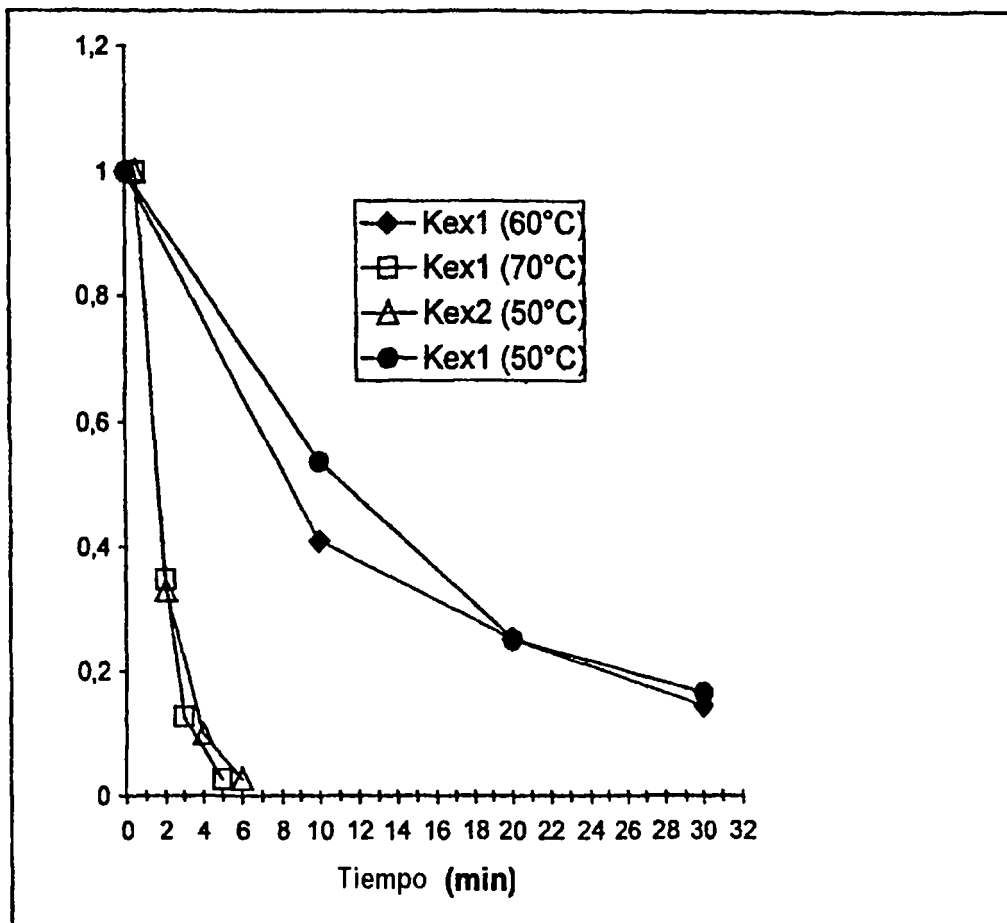


Figura 3

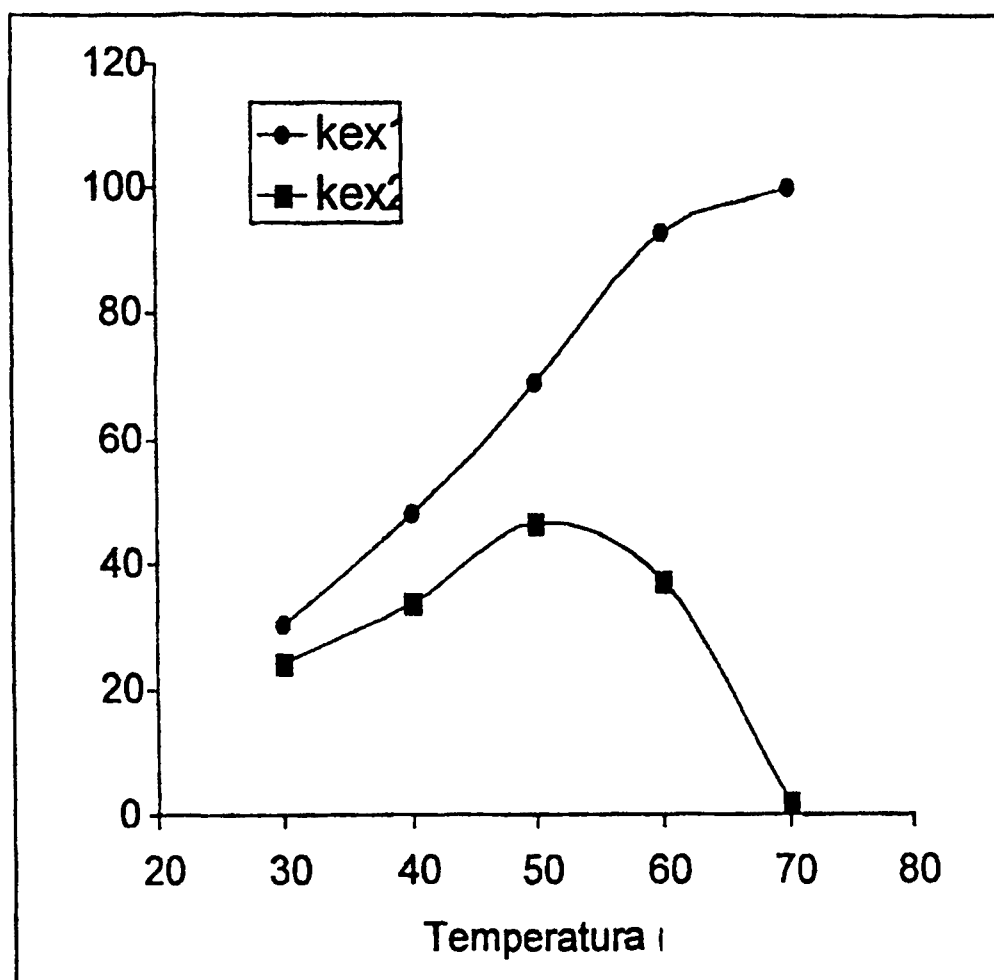


Figura 4

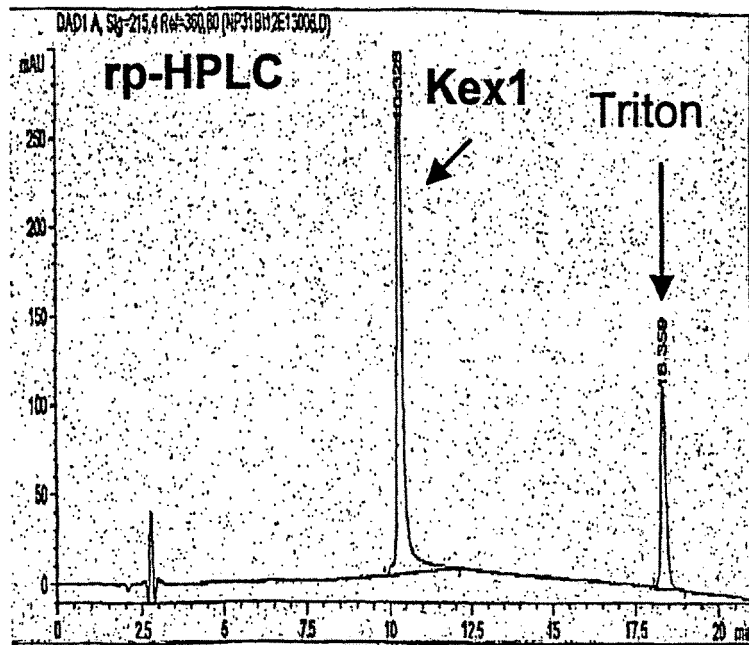


Figura 5

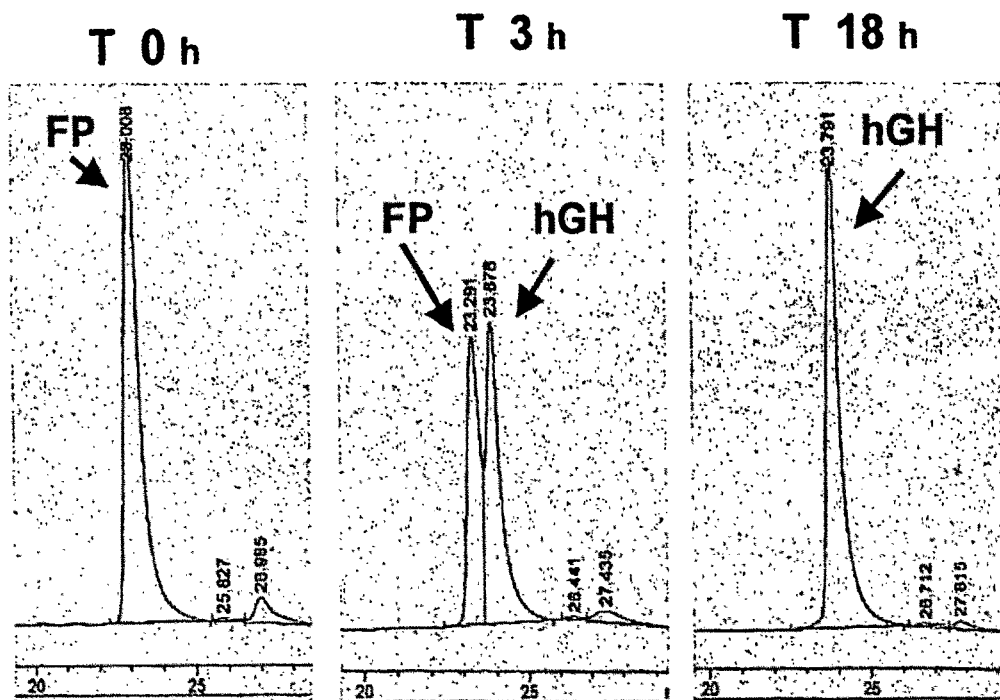


Figura 6

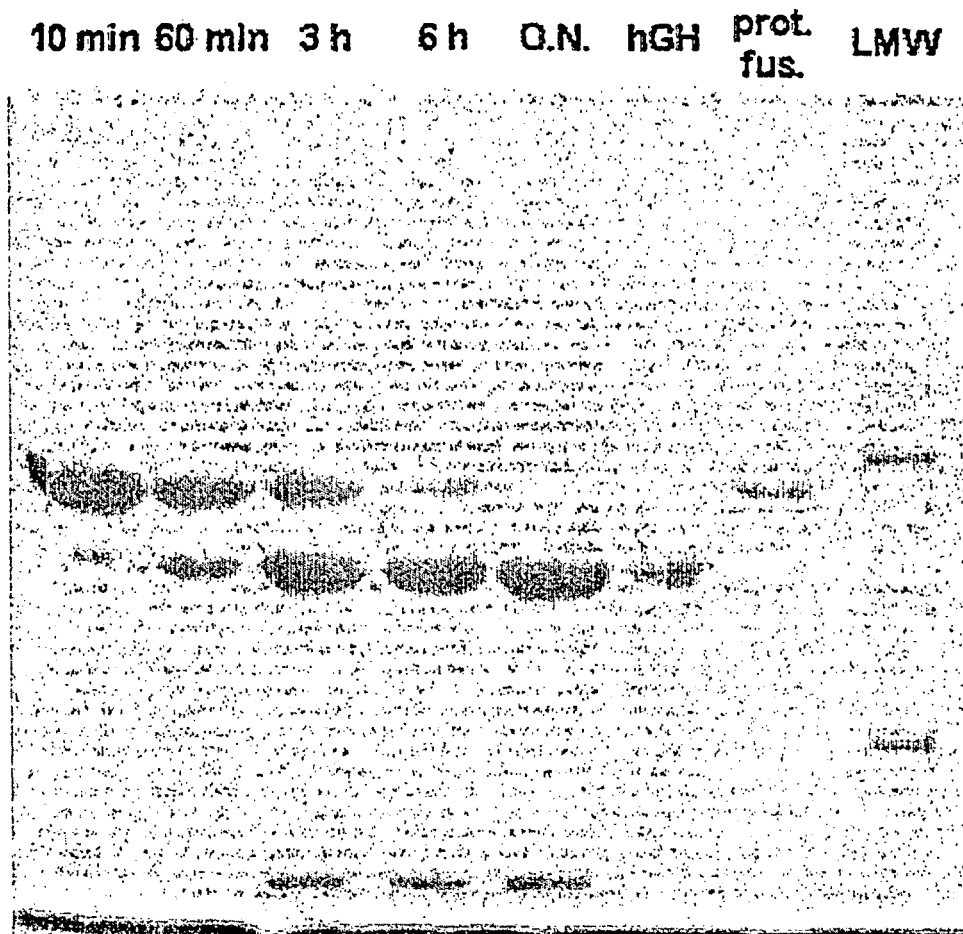


Figura 7

# ES 2 265 454 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Keryos Spa

5 <120> Nuevas endoproteasas solubles para el procesamiento *in vitro* de proteínas recombinantes

<130> 01nv22e

10 <140>

<151>

<150> MI2000A2465

15 <151> 2000-11-16

<160> 2

20 <170> PatenIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1929

25 <212> ADN

<213> *Kluyveromyces lactis*

<400>

30

```
atgatactat cgtcgcagct catgctagct ttaatagcag tgtcaggata cggtaaagca 60
atgcaagttc ctaaaaaaga ccacgaaaat aggcagtatt ttgcaattga atcttatgat 120
gatgtaggta atctactagc ggaacacagt gactggagtt tcgagcacga tgttcgaggc 180
cttgccaatc actatgtgtt ctcgaaaccg ttgcagagtt tgggtaaacg agatgcgatt 240
gacacaggat attcagaaaa catcattgat ttccaagatc taccctccgt tcagttacac 300
aaaagattgc ctattgggga ttctagtagt gaacaaatcc agaacgctag aattcttttc 360
aatatthctg atccattggt tgatcagcag tggcacttga tcaatccaaa ctaccctgga 420
aatgacgtta acgtaactgg tttatggaaa gaaaacatca ctggctatgg tgtagtggca 480
gcattggtgg atgatggatt ggattatgag aacgaagatt taaaagacaa tttctgtgtt 540
gaaggttctt gggattttaa tgacaacaac ccattgccga agccaaggct aaaagatgat 600
taccatggta cccgctgcgc aggtgaaata gcggctttcc gtaatgatat ttgtgggggt 660
gggtgcgect. ataactctaa ggtatccggt atcagaattt tgtcaggcca gatcacagcc 720
gaagatgagg ctgcttcatt aatttatgga ctagacgtta atgatattta ctcttgctcg 780
tggggtccat ctgatgacgg taaaactatg caagcgcgg atacattagt aaaaaaggca 840
atcataaaag gtgtaacaga aggacgagat gcaaaagggtg cactatatgt atttgcgagt 900
gggaatggtg gtatgthtgg cgacagctgc aactttgacg gctacacaaa ctctatattt 960
tctatcactg taggtgcat tgattggaag ggcctacatc ctccatattc tgaatcatgt 1020
tctgctgtaa tggttgttac ttattcttgc ggatcaggaa attacataaa aacaacagat 1080
ttagacgaaa aatgttccaa tacgcatgga ggcaactcag ctgcagctcc tcttgcaget 1140
ggtatatata ctttagtgct ggaagctaac ccgaacttaa catggcgaga tgtacaatac 1200
ctctcaatat tgagctctga ggaaataaat ccgcacgatg gaaagtggca ggatacagct 1260
atgggaaage gttattctca cacatatgga tttggaaaac ttgatgcata taacattgtc 1320
catatggcaa aaagttggat caatgtaaac ccacaagggt ggctttacct tcctacaate 1380
```

65

ES 2 265 454 T3

gttgaaaac agtctatcag taattcagat gaagttatag aatccacagt ctcagtttct 1440  
gctgaagagt ttaaacaaaa taacctaaaa aggttggaac atgtcactgt aactgtcgat 1500  
atagacgcac cttaccgtgg acatgtctta gtagatctaa tatcgctga tggagttaca 1560  
tctaccttag cgacagctag acgtttagat aaaaaccgct atggttttca aaattggact 1620  
ttcatgtctg tcgcgcactg gggctctagt ggagttggaa gctggaaatt aaaagtaaag 1680  
tctacgcagc ataataaagt tgtaacactc aaatcttggg gattaaagat gtttggagaa 1740  
actatcgatg caaagaaggg caaagtgata tcatatggaa atgacaaaaga ggatgctgaa 1800  
gtaagagta ccgaatctaa aaccacaact cccactgcac aaacttcgtc attcacgacg 1860  
acttctggag aagaaacatc tggtgcaaat aagttgcctc gtcccgaaca ggctgcccag 1920  
ttatacttg 1929

<210> 2

<211> 643

<210> PRT

<213> *Kluyveromyces lastis*

<400> 2

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

ES 2 265 454 T3

Ala Leu Val Asp Asp Gly Leu Asp Tyr Glu Asn Glu Asp Leu Lys Asp  
 165 170 175

5 Asn Phe Cys Val Glu Gly Ser Trp Asp Phe Asn Asp Asn Asn Pro Leu  
 180 185 190

10 Pro Lys Pro Arg Leu Lys Asp Asp Tyr His Gly Thr Arg Cys Ala Gly  
 195 200 205

15 Glu Ile Ala Ala Phe Arg Asn Asp Ile Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr  
 210 215 220

20 Asn Ser Lys Val Ser Gly Ile Arg Ile Leu Ser Gly Gln Ile Thr Ala  
 225 230 235 240

Glu Asp Glu Ala Ala Ser Leu Ile Tyr Gly Leu Asp Val Asn Asp Ile  
 245 250 255

25 Tyr Ser Cys Ser Trp Gly Pro Ser Asp Asp Gly Lys Thr Met Gln Ala  
 260 265 270

30 Pro Asp Thr Leu Val Lys Lys Ala Ile Ile Lys Gly Val Thr Glu Gly  
 275 280 285

35 Arg Asp Ala Lys Gly Ala Leu Tyr Val Phe Ala Ser Gly Asn Gly Gly  
 290 295 300

40 Met Phe Gly Asp Ser Cys Asn Phe Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Phe  
 305 310 315 320

Ser Ile Thr Val Gly Ala Ile Asp Trp Lys Gly Leu His Pro Pro Tyr  
 325 330 335

45 Ser Glu Ser Cys Ser Ala Val Met Val Val Thr Tyr Ser Ser Gly Ser  
 340 345 350

50 Gly Asn Tyr Ile Lys Thr Thr Asp Leu Asp Glu Lys Cys Ser Asn Thr  
 355 360 365

55 His Gly Gly Thr Ser Ala Ala Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Tyr Thr  
 370 375 380

Leu Val Leu Glu Ala Asn Pro Asn Leu Thr Trp Arg Asp Val Gln Tyr  
 385 390 395 400

60 Leu Ser Ile Leu Ser Ser Glu Glu Ile Asn Pro His Asp Gly Lys Trp  
 405 410 415

65

ES 2 265 454 T3

Gln Asp Thr Ala Met Gly Lys Arg Tyr Ser His Thr Tyr Gly Phe Gly  
 420 425 430  
 5  
 Lys Leu Asp Ala Tyr Asn Ile Val His Met Ala Lys Ser Trp Ile Asn  
 435 440 445  
 10  
 Val Asn Pro Gln Gly Trp Leu Tyr Leu Pro Thr Ile Val Glu Lys Gln  
 450 455 460  
 15  
 Ser Ile Ser Asn Ser Asp Glu Val Ile Glu Ser Thr Val Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 20  
 Ala Glu Glu Phe Lys Gln Asn Asn Leu Lys Arg Leu Glu His Val Thr  
 485 490 495  
 25  
 Val Thr Val Asp Ile Asp Ala Pro Tyr Arg Gly His Val Leu Val Asp  
 500 505 510  
 30  
 Leu Ile Ser Pro Asp Gly Val Thr Ser Thr Leu Ala Thr Ala Arg Arg  
 515 520 525  
 35  
 Leu Asp Lys Asn Arg Tyr Gly Phe Gln Asn Trp Thr Phe Met Ser Val  
 530 535 540  
 40  
 Ala His Trp Gly Ser Ser Gly Val Gly Ser Trp Lys Leu Lys Val Lys  
 545 550 555 560  
 45  
 Ser Thr His Asp Asn Glu Ile Val Thr Leu Lys Ser Trp Arg Leu Lys  
 565 570 575  
 50  
 Met Phe Gly Glu Thr Ile Asp Ala Lys Lys Ala Lys Val Ile Ser Tyr  
 580 585 590  
 55  
 Gly Asn Asp Lys Glu Asp Ala Glu Val Lys Ser Thr Glu Ser Lys Thr  
 595 600 605  
 60  
 Thr Thr Pro Thr Ala Gln Thr Ser Ser Phe Thr Thr Thr Ser Gly Glu  
 610 615 620  
 65  
 Glu Thr Ser Gly Ala Asn Lys Leu Pro Arg Pro Glu Gln Ala Ala Gln  
 625 630 635 640  
 66  
 Leu Tyr Leu