



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 337 666**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03006426 .5**
(96) Fecha de presentación : **21.03.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1348760**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

(54) Título: **Elaboración de mutantes de una fosfatasa alcalina, inactivos o de reducida actividad y su expresión en levadura.**

(30) Prioridad: **25.03.2002 DE 102 13 201**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2010

(72) Inventor/es: **Mueller, Rainer;**
Thalhofer, Johann-Peter;
Geipel, Frank;
Hoelke, Werner y
Kirschbaum, Thomas

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

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Elaboración de mutantes de una fosfatasa alcalina, inactivos o de reducida actividad y su expresión en levadura.

La presente invención, se refiere a un procedimiento para la fabricación recombinante o, respectivamente, la expresión de mutantes de una fosfatasa alcalina eucariótica, los cuales son inactivos de reducida actividad. La invención, se refiere, además, a DNAs con codones optimizados, basados en la secuencia de ácido nucleico, los cuales codifican para una fosfatasa alcalina, altamente activa, y que se modifican mediante una mutagénesis seleccionada como objetivo, de tal forma que, ésta codifique para una fosfatasa alcalina de actividad reducida, o inactiva. La invención, se refiere, además, a un procedimiento para la inserción de los DNA mutantes, en un vector, para la expresión en células de levadura, así como a un procedimiento para la expresión de los mutantes de fosfatasa alcalina.

Las fosfatasas alcalinas (AP), son fosfomonoesterasas no específicas, dímeras, que contienen zinc, las se encuentran tanto en los organismos procarióticos como en los organismos eucarióticos, como por ejemplo, en *E. coli* y mamíferos (McComb *et al.*, 1979 Alkaline Phosphates, Plenum Press, New York). La comparación de la estructura primaria de las fosfatasas alcalinas, proporcionó un alto grado de homología (un porcentaje del 25-30% de homología, entre *E. coli* y mamíferos-AP; Millán, 1988 Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris, 1989, Clin. Chim. Acta 186, 133-150).

En los hombres y en los animales superiores, la familia de las AP (fosfatasas alcalinas), consta de cuatro miembros, los cuales se codifican en diversos locus de genes (Millan, 1988, Anticancer Res. 8, 995-1004; Harris, 1989, Clin. Chim. Acta 186, 133-150). A la familia de las fosfatasas alcalinas, pertenecen las APs específicas de tejidos (AP de placenta (PLP), AP de células de gérmenes (GCAP), y AP del intestino (IAP), y la APs no específicas de tejidos (TnAP), las cuales se encuentran principalmente localizadas en el hígado, lo riñones, y los huesos.

Una propiedad determinante de las APs hasta ahora conocidas, es la gran variabilidad en la actividad catalítica de las APs de los mamíferos, las cuales poseen un valor de k_{cat} , correspondiente a un nivel 10-100 veces mayor que las AP de *E. coli*. Por debajo de las APs de los mamíferos, las APs del intestino bovino (biAP), son las que presentan las mayores actividades específicas. Esta propiedad, convierte a las biAPs, en atractivas, para la aplicación o utilización bioquímica, como por ejemplo, la aplicación de los correspondientes conjugados enzimáticos como reactivo de diagnóstico, o para la desforolización de DNA. La existencia de diversas fosfatasas alcalinas, procedentes del intestino bovino, con distintas actividades altamente específicas, se describe en el documento de patente europea EP 0 955 363 ó, respectivamente, en Manes *et al.* (1988), J. Biol. Chem. 273 n° 26, 23353-23360. Hasta ahora, se ha descrito un expresión recombinante de fosfatasas alcalinas eucarióticas de reducida actividad (hasta 3000 U/mg), en diversas líneas celulares eucarióticas como por ejemplo, células CHO (biAP I/WO93/1813 9; Weissig *et al.* 1993, Biochem J. 260, 503-508), en células COS (humane Placenta-AP/Berger *et al.*, 1987 Biochemistry 84, 4885-4889) o en sistemas de expresión de los Baculovirus (humane Placenta-AP/Davis *et al.* 1992, Biotechnology 10, 1148-1150). La expresión de APs altamente activas (actividad específica > 3000 U/mg) procedentes del intestino bovino, en células COH (biAP II, III y IV/Manes *et al.* 1998, J. Biol. Chem. 273 No. 36, 23353-23360), se encuentra también descrita. Un inconveniente de la expresión de fosfatasas alcalinas, en estos sistemas de expresión, reside, no obstante, en el reducido rendimiento o capacidad de expresión, la cual convierte a la fabricación recombinante de fosfatasas alcalinas eucarióticas, en no comercialmente rentables.

Una expresión de fosfatasas alcalinas eucarióticas, en huéspedes de expresión procarióticos, como por ejemplo, *E. coli*, es de hecho principalmente posible (humane Placenta-AP/Beck and Burtscher, 1994, Protein Expression and Purification 5, 192-197), pero, no obstante, las fosfatasas alcalinas expresadas en procariotas, no presentan ninguna glicosilación, la cual es esencial, en la fabricación de conjugados enzimáticos, según el procedimiento de conjugación.

Una aplicación frecuente de las fosfatasas alcalinas, como conjugados enzimáticos, es un complejo con un anticuerpo. Junto a ello, la fosfatasa alcalina, se conjuga con un anticuerpo, el cual está dirigido contra un antígeno determinado. En primer lugar, este antígeno, se une, en una primera reacción, a partir de un anticuerpo inmovilizado en la pared vascular, el cual reconoce a otro epítipo en el antígeno diana, como un conjugado anticuerpo-AP. Este complejo anticuerpo-antígeno, se identifica entonces, en una segunda reacción, mediante el enlace o unión del conjugado anticuerpo-AP. Mediante los tests de ensayo de ese tipo, se llega siempre a unos resultados de falsos positivos, provocados por un enlace o unión inespecífico del conjugado anticuerpo-AP, con la pared vascular, o con el primer anticuerpo. Estas perturbaciones, puede evitarse mediante la adición de un conjugado con un mutante de AP, inactivo o de reducida actividad, en una cantidad en exceso, como proteína antiparasitaria (de eliminación de las perturbaciones). Con objeto de actuar de una forma muy específica como proteína antiparasitaria (de eliminación de las perturbaciones), es no obstante también un requisito indispensable, además de la reducida actividad, o de la inactividad, una estructura terciaria y cuaternaria de los mutantes de AP, en gran parte igual o semejante.

Correspondientemente en concordancia, la presente invención, tiene la finalidad de producir mutantes de la fosfatasa alcalina, como proteína antiparasitaria, mediante una mutagénesis seleccionada, los cuales son de reducida actividad, o totalmente inactivos, que no obstante, en su secuencia de aminoácidos sólo se encuentran modificados de una forma insignificante, y en la estructura terciaria o cuaternaria, de la mejor forma, no se encuentran modificados. Adicionalmente, además, es una finalidad de la presente invención, el desarrollar un procedimiento de expresión, que sea estable y resistente, para la fabricación de mutantes de fosfatasa alcalina, eucarióticos, glicosilados, los cuales, además, debido a su alto rendimiento o capacidad de expresión, posibiliten una fabricación económicamente rentable de un mutante de fosfatasa alcalina correspondientemente en concordancia.

Son una finalidad de la presente invención, mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, en donde,

- la frecuencia a mutar, es la SEQ ID NO:2, y

• el mutante, presente una actividad reducida como mínimo en un factor de 100, en comparación con la del tipo salvaje,

• el mutante, presente una o varias de las mutaciones que se citan a continuación, y en donde, la posición de la mutación, se encuentra definida con relación a la SEQ ID NO: 2:

Ser92: por Ala ó Gly

His320: por Asn ó Phe

Gly 322: por Phe ó Lys,

Bajo la definición de mutación de las secuencia de aminoácidos, se entiende la sustitución de los aminoácidos de origen natural, en las posiciones deseadas, por cualquier otro aminoácido, a voluntad, que no impida el pliegue en la correcta estructura terciaria y cuaternaria, y que no obstante, no sean funcionales.

La secuencia a mutar (tipo salvaje), puede ser, por ejemplo, la consistente en una AP intestinal, humana, o una AP de placenta, humana. Adicionalmente, además, en concordancia con la presente invención, como AP de tipo salvaje, entran en consideración una AP infraactiva (es decir, de reducida actividad) o una AP hiperactiva, procedente del intestino bovino. Todas estas enzimas, son por lo menos un 77% homólogas a la SEQ ID NO: 2. La homología, se determinó con un sistema informático de Software, del tipo "Open VMS Vax Version V6.2"; (Copyright (c) 1982-2001, Genetics Computer Group, Inc.; A wholly owned subsidiary of Oxford Molecular Group, Inc. All rights reserved. Published research assisted by this software should cite: Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.).

Los datos de la posición de los aminoácidos a mutar, se refiere a secuencia de aminoácidos de la fosfatasa alcalina según la SEQ IND NO: 2, sin secuencia de señal. Las posiciones de aminoácidos identificadas, son también no obstante transferibles a otras fosfatadas alcalinas procedentes de animales bovinos o de otros organismos; las modificaciones, se refieren a aminoácidos con funciones altamente conservadas, dentro de las proteínas y, así, de este modo, únicamente debe ajustarse la posición, según la secuencia de aminoácidos correspondiente.

Mutagénesis seleccionada de las secuencia de DNA, significa el hecho de que, los condones individuales o los múltiples codones, se modifican vía mutagénesis por PCR. Adicionalmente, además, se realizan tan pocas modificaciones como sea posible, en el triplete de bases, modificándose, en el caso más favorable, únicamente una base de gen optimizado con codones, en concordancia con la SEQ ID NO: 3.

De una forma preferible, se trata, en concordancia con la presente invención, de mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, según la reivindicación 1, en donde, el mutante, presenta una o varias de las mutaciones que se citan a continuación, y en donde, la posición de la mutación, se encuentra definida con relación a la SEQ ID NO: 2:

Ser92: por Ala ó Gly

His320: por Asn ó Phe

Gly 322: por Phe ó Lys.

En concordancia con la presente invención, se prefieren los mutantes anteriormente mencionados, arriba, de la fosfatasa alcalina eucariótica, en donde, la enzima, según la secuencia de tipo salvaje, presenta un actividad específica de más de 700 U/mg. Adicionalmente además, es ventajosa, como secuencia genética, un secuencia de DNA, la cual, basándose en el gen, el cual codifica para un mutante de fosfatasa alcalina eucariótica, con una actividad específica correspondiente a un valor que se encuentra por encima de 700 U/mg, se ha mutado, de una forma seleccionada, en pocas posiciones, de tal forma que, la secuencia de este modo originada, codifica para una secuencia de aminoácidos de los mutantes de fosfatasa alcalina eucariótica, modificados en una o pocas posiciones, a cuyo efecto, las mutaciones, conducen a una reducción de la actividad específica, que puede ser desde muy fuerte hasta total.

Se prefieren, especialmente, los mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, en concordancia con la presente invención, en donde, el mutante, presenta una actividad de la AP, reducida en un valor correspondiente a un factor de 100, en comparación con la enzima del tipo salvaje. Adicionalmente, además, se prefieren los mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, en concordancia con la presente invención, en donde, el mutante, presenta una actividad de la AP, reducida en un valor correspondiente a un factor de 1000, en comparación con la enzima del tipo salvaje. Se prefieren, de una forma muy especial, en concordancia con la presente invención, aquéllos mutantes, en los cuales, la reducción de la actividad específica, se encuentra a un nivel por debajo del margen de identificación (determinado según los tests de ensayo de actividad, realizados en el ejemplo 4).

ES 2 337 666 T3

En concordancia con la presente invención, se han evidenciado como siendo apropiadas, la posiciones de aminoácidos Asp316/His320/His432 (compañero de enlace del átomo de zinc 1), Asp42/Asp357/His358 (compañero de enlace del átomo de zinc 2), Ser155/Glu311 (compañero de enlace del átomo de magnesio), Ser92 (el grupo hidroxilo, se desprotoniza, para el ataque nucleofílico sobre el sustrato) (Ma and Kantrowitz (1994), J. Biol. Chem., 16 pp. 31614-31619; Ma *et al.* (1995), Protein Science, 4, pp. 1498-1506; Kimura and Kikuta (2000) JBIC 5, pp. 139-155; Stec *et al.* (2000), JMB 299 pp. 1303-1311) así como Gly322 (importante para la actividad específica; EP 0 955 369).

En concordancia con la presente invención, entran en consideración las posiciones anteriormente descritas, arriba, como mutantes individuales, o bien, no obstante, también, en todas las combinaciones posibles de las anteriormente descritas posiciones, como mutantes dobles, triples o múltiples. Se prefieren, de una forma especial, todas las secuencias de aminoácidos mutadas (modificadas), según las SEQ ID NO's: 4-7, en donde, la SEQ ID NO.: 4 representa un mutante individual en la posición 92 (Ser92Ala), la SEQ ID NO.: 5 representan un mutante individual en la posición 322 (Gly322Phe), la SEQ ID NO.: 6 representa un mutante doble en las posiciones 320 y 322 (His320Asn/Gly322Phe) y la SEQ ID NO.: 7 representa un mutante triple en las posiciones 92, 320 y 322 (Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe). Las secuencias de DNA que pertenecen adicionalmente, se representan en las SEQ ID NO.: 8-11.

Es una finalidad adicional de la presente invención, un DNA, el cual codifique para los mutantes en concordancia con la presente invención, anteriormente descritos, arriba. Adicionalmente, además, son una finalidad de la presente invención, vectores, los cuales contengan las secuencias de ácidos nucleicos en concordancia con la presente invención. De una forma particular, se trata de aquellos vectores que contienen una secuencia de ácido nucleico, a cuyo efecto, la secuencia de ácido nucleico, se elige de entre de las secuencias de identificación SEQ ID Nos 4-7. Los vectores apropiados, son conocidos, por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, como por ejemplo, pPICZ α A, B, C; pPICZ, pPICZ-E, pPICZ α -E; pPIC6, pPIC6 α A, B, C; pGAPZ, pGAPZ α A, B, C; pPIC9; pPIC9K, pPIC3.5, pPIC3.5K, pAO 815, pMET, pMET α A, B, C; pYES-Dest52, pYES2.1/V5-His-TOPO, pYC2-E, pYES2.1-E; vectores Yes, pTEF1/Zeo, pTEF1/Bsd, pNMT-TOPO (como por ejemplo, Invitrogen). Se clonan las respectivas secuencias genéticas, por ejemplo, en los vectores pPICZ α A ó, respectivamente, pPIC9K, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado (de procedencia de la firma Invitrogen), y aquellas que contienen la secuencias genéticas, según las SEQ ID NO's: 8-11, las cuales se encuentran bajo el control de los promotores AOX1. A título de referencia, para los vectores fabricados en concordancia con la presente invención, cítense los vectores pNaAP31-1 (Fig. 1) y pNaAP31-2 (Fig. 2), los cuales contienen la secuencia genética SEQ ID NO.: 8 respectivamente clonada en pPICZ α A(pNaAP31-1) y pPIC9K (pNaAP31-2).

Los vectores pNaAP31-1 y pNaAP31-2, son relevantes, en igual medida, para los vectores producidos en concordancia con la presente invención, ya que, el clon producido, al final, puede contener copias de ambos vectores.

Un vector de expresión obtenido en concordancia con la presente invención, se transforma, de una forma preferible, en diversas cepas de levadura, como por ejemplo, la *Pichia pastoris*, y se integra, de una forma estable, en el genoma. La integración estable en el genoma de levadura, tiene la ventaja, de una forma particular, consistente en el hecho de que, en la producción posterior de, por ejemplo, los mutantes de fosfatasa alcalina de reducida actividad, o inactivos, en fermentadores de grandes volúmenes, no es necesaria ninguna presión de selección. La integración estable en el genoma, significa el hecho de que, el vector de expresión, se incorpora en el genoma, mediante una recombinación homóloga de, por ejemplo, *Pichia pastoris*, y con ello, se hereda genéticamente, como una parte integrante fija del genoma de la levadura (Cregg, J.M. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5 (1985), 3376-3385).

Adicionalmente, además, es una finalidad de la presente invención, una cepa huésped, transformada con uno de los vectores en concordancia con la presente invención. Como huéspedes de levadura, son apropiados, de una forma particular, las levaduras metilótrofas, como por ejemplo, la levaduras *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* ó *Schizosaccharomyces pombe*. De una forma especialmente preferida, como cepa huésped, se utiliza la *Pichia pastoris*. Se prefiere, de una forma especial, la cepa de *Pichia pastoris* X-33, transformada con uno de los vectores descritos.

Es también una finalidad de la presente invención, un procedimiento para la fabricación de los mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, en concordancia con la presente invención, en células de levadura, que comprende las etapas de: a) clonación de una secuencia genética en concordancia con la presente invención, en distintos vectores, b) transformación de la levadura, c) expresión, y d) purificación de la fosfatasa alcalina, caracterizado por el hecho de que,

- un primer vector, presenta un gen de resistencia, contra un primer marcador de selección,
- los transformantes, los cuales han integrado el gen de resistencia y la secuencia genética deseada, en el genoma, se seleccionan, mediante el crecimiento sobre un medio nutritivo, con una reducida concentración del primer marcador de selección.
- el número de copias genéticas, se aumenta mediante transformación múltiple, a cuyo efecto, las transformaciones múltiples, se seleccionan, mediante el crecimiento sobre un medio nutritivo, con presión de selección elevada,
- se añade un segundo vector, el cual presenta un gen de resistencia contra un segundo marcador de selección,

- el número de copias genéticas, se aumenta mediante transformación múltiple con el segundo vector, a cuyo efecto, los transformantes múltiples, se seleccionan mediante crecimiento sobre el medio nutritivo, con una presión de selección elevada, y

- 5 - se seleccionan aquéllos clones, los cuales han integrado, al genoma, varias copias de la secuencia genética y genes de resistencia al marcador de selección.

De una forma preferible, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, se utilizan células de levadura metilotrofas. De una forma especialmente preferible, como célula de levadura, se utiliza la *Pichia pastoris*.

- 10 Es adicionalmente preferible, para el procedimiento en concordancia con la presente invención, el hecho de que, como vector, se utilice uno de tal tipo que corresponda a un vector, el cual se elija de entre el siguiente grupo de vectores: pPICZ α A, B, C; pPICZ, pPICZ-E, pPICZ α -E; pPIC6, pPIC6 α A, B, C; pGAPZ, pGAPZ α A, B, C; pPIC9; pPIC9K, pPIC3.5, pPIC3.5K, pAO 815, (Invitrogen).

- 15 El aumento del número de copias de la secuencia genética mutada (modificada) en las levaduras metilotrofas, se consigue mediante transformación múltiple, mediante el aumento simultáneo de la presión de selección, con un marcador de selección apropiado, como por ejemplo, un antibiótico, como el Zeocin® (zeocina) ó, respectivamente, la gentamicina (G18), a cuyo efecto, solo permanecen clones susceptibles de poder vivir, los cuales hayan integrado varias copias del vector de expresión, de una forma estable, en el genoma. Con objeto de ser resistentes contra altas concentraciones de antibiótico utilizado como marcador de selección, es necesario el hecho de que, los clones, produzcan proteínas de resistencia multiplicada (aumentada). Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante una integración múltiple del vector de expresión, el cual, además de la casete de expresión para los respectivos mutantes de AP, como por ejemplo, el mutante de fosfatasa alcalina Ser92Ala, contenga, también, el gen de resistencia para el antibiótico
25 utilizado como marcador de selección.

La función de los mutantes de fosfatasa alcalina, en un procedimiento de expresión, resistente y estable, con una alta capacidad de expresión y, simultáneamente, con un rendimiento productivo económicamente rentable, puede lograrse mediante los procedimientos que se describen a continuación.

- 30 La mutagénesis seleccionada para la fabricación de los mutantes en concordancia con la presente invención, se realizó del siguiente modo: Basándose en el gen que codifica para un mutante de fosfatasa alcalina de animal vacuno (vaca), y el cual se fabricó sintéticamente, se diseñaron oligonucleótidos complementarios o solapados, los unos con los otros, los cuales se modificaron en una o en varias posiciones de bases, con respecto a la SEQ ID NO:3. Uno de estos cebadores, se aplicó, a continuación, como compañero, con los cebadores 5'- ó, respectivamente, 3', que se describen posteriormente, a continuación y, así, de este modo, se amplificó con el gen AP, en dos fragmentos, con la deseada o las deseadas modificaciones de bases.

- Los dos segmentos, se analizan, a continuación, por medicación electroforesis en gel de agarosa, se aíslan los
40 productos con la longitud esperada, del gel, mediante un equipo de extracción, a modo de kit, del tipo "QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) y, en una reacción de PCR adicional, se sintetizan hasta su conversión en el producto genético completo. La reacción de PCR, se realizó, a dicho efecto, en los primeros 5 ciclos, sin la adición del cebador, en el extremo 5' y en el extremo 3' del gen completo, de tal forma que, en primer lugar, a partir de los dos segmentos, se originen pocos fragmentos del producto genético de la longitud esperada. La temperatura de reasociación, se rige, a
45 dicho efecto, por la temperatura de fusión de la zona de solapado. A continuación, se procedió a añadir los cebadores fijos en los extremos y, la temperatura de reasociación, se incrementó, correspondientemente en concordancia con la temperatura de reasociación de los cebadores. En 25 ciclos adicionales, se amplificó ampliamente, a continuación, el fragmento genético de la longitud esperada.

- 50 La preparación resultante de la PCR, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y, el fragmento genético, se aisló con el tamaño esperado (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen).

La clonación de un fragmento de PCR correspondientemente en concordancia, la transformación en *Pichia pastoris*, así como la expresión de los correspondientes mutantes de AP, se encuentran descritos en el ejemplo 2.

- 55 La recombinación de mutantes de fosfatasa alifática, pueden aislarse de la biomasa, mediante procedimientos de extracción, los cuales son en principio conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, como por ejemplo, según "Protein Purification", Springer Verlag, Herausg. Robert Scopes (1982). Mediante procedimientos adecuados de cromatografía, como, especialmente, con la utilización de materiales de columna hidrófobos, y un intercambiador catiónico, se obtiene un producto purificado en bandas.

- Mediante la presente invención, se describe así, de este modo, por primera vez, el cual corresponde a una fabricación económicamente rentable de mutantes de fosfatasa alcalina recombinantes, de mamíferos, como por ejemplo, del intestino de animales vacunos (vaca), en levaduras, los cuales contienen una actividad de AP fuertemente reducida, o
65 que no contienen ninguna actividad reactiva y que, por lo demás, no obstante, corresponden, en sus características, a los mutantes de fosfatasa alcalina recombinante procedentes del intestino de animales vacunos. Estos mutantes, pueden emplearse, no obstante, de una forma particular, como proteína desparasitante, en tests de ensayos inmunológicos, en los cuales, la AP, actúa como marcador, como MTP-ELISA.

ES 2 337 666 T3

Figuras

Figura 1

5 Mapa de plásmido del vector de expresión pNaAP31-1, con la secuencia genética mutante SEQ ID NO: 8 en pICZ α A (Invitrogen).

Figura 2

10 Mapa de plásmido del vector de expresión pNaAP31-1, con la secuencia genética mutante SEQ ID NO: 8 en pICZ9K (Invitrogen).

15 *Ilustraciones de los protocolos de secuencia SEQ ID NO's 1-21*

SEQ ID NO: 1 Secuencia de DNA nativa que codifica para la AP altamente activa de animal vacuno, sin señal de secuencia.

20 SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de AP altamente activa de animal vacuno.

SEQ ID NO: 3 Secuencia de DNA de gen sintético que codifica para una AP altamente activa, encontrándose, corriente arriba de la secuencia codificante, el sitio de corte de restricción EoRI, y corriente abajo el sitio de corte de restricción Asp 718.

25 SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos del mutante individual de AP Ser 92 Ala (tipo salvaje: AP altamente activa de animal vacuno).

30 SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos del mutante individual de AP Gly 322 Phe (tipo salvaje: AP altamente activa de animal vacuno).

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos del mutante doble de AP Ser 92 Ala/His 320/Gly 322 Phe (tipo salvaje: AP altamente activa de animal vacuno).

35 SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos del mutante triple de AP Ser 92 Ala/His 320/Gly 322 Phe (tipo salvaje: AP altamente activa de animal vacuno).

40 SEQ ID NO: 8 Secuencia de DNA del gen sintético que codifica para el mutante individual de AP Ser 92 Ala los sitios de corte EcoRi, respectivamente, Asp 718, corriente arriba, respectivamente, corriente abajo, de la secuencia codificadora.

45 SEQ ID NO: 9 Secuencia de DNA del gen sintético que codifica para el mutante individual de AP Gly 322 Phe con los sitios de corte EcoRi, respectivamente, Asp 718, corriente arriba, respectivamente, corriente abajo, de la secuencia codificadora.

SEQ ID NO: 10 Secuencia de DNA del gen sintético que codifica para el mutante doble de AP His 320 Asn/Gly 322 Phe con los sitios de corte EcoRi, respectivamente, Asp 718, corriente arriba, respectivamente, corriente abajo, de la secuencia codificadora.

50 SEQ ID NO: 11 Secuencia de DNA del gen sintético que codifica para el mutante triple de AP Ser 92 Ala/His 320 Asn/Gly 322 Phe con los sitios de corte EcoRi, respectivamente, Asp 718, corriente arriba, respectivamente, corriente abajo, de la secuencia codificadora.

55 SEQ ID NO's: 12-21 Secuencias de DNA que sirven como cebadores

Abreviaturas

60	YDP:	Levadura peptona dextrosa
	YDPS:	Levadura peptona dextrosa sorbitol
	BMGY:	Medio de complejo de glicerol tamponado
65	BMMY:	Medio de complejo de metanol tamponado
	MTP:	Placas de microtítulo

Ejemplos

Mutagénesis de la secuencia sintética de DNA, la cual codifica para los mutantes de fosfatasa alcalina procedentes de animales vacunos

5

Para la mutagénesis de los tripletes de bases, vía reacción de PCR, se procedió a diseñar oligonucleótidos, los cuales poseyeran una secuencia de bases modificada correspondientemente en concordancia, y que fueran complementarios o, respectivamente, parcialmente complementarios, solapándose parcialmente entre ellos. Estos oligonucleótidos, se insertaron, a continuación, como respectivos compañeros, al cebador 5' consistente en el cebador 5'-hAPa, según la SEQ IN NO: 12, y respectivamente, al cebador 3' consistente en el cebador 3'-hAP, según la SEQ ID NO: 13, los cuales hibridan, respectivamente, con el extremo 5' y respectivamente el extremo 3' del gen que codifica a los mutantes de la fosfatasa alcalina procedente de animal vacuno (vaca). Con ello, se amplificaron, en una primera reacción, las secuencias genéticas mutantes, en dos segmentos, a cuyo efecto, el primer segmento, porta la mutación en extremo 3' y, el segundo segmento, porta la mutación en el extremo 5', y una corta secuencia de bases, en el extremo 3', procedente del primer segmento, es idéntica a una corta secuencia de bases del extremo 5' del segundo segmento.

En una segunda reacción de PCR, se procedió, entonces, a fusionar estos dos segmentos al producto genético de longitud total. Adicionalmente, además, se procedió, en primer lugar, a iniciar la reacción, sin los cebadores 5'-hAP y 3'-hAP, según las SQ ID NO: 12 y 13, y se realizaron 15 ciclos. Con ello, se originan pocas moléculas del producto genético de longitud total, en las cuales, la temperatura de reasociación, en estos 5 ciclos, se rija por la temperatura de fusión del sector de solapado de ambos segmentos. A continuación, se añadieron los cebadores 5' y 3' según las SEQ ID NO: 12 y 13, se ajustó la temperatura de reasociación a la temperatura de fusión del cebador con la temperatura de fusión más baja, y se amplificó el producto genético de longitud total, en 25 ciclos adicionales.

25

Mutagénesis para la generación del mutante individual Ser92Ala

Para la generación del mutantes individual Ser92Ala, se mutó el triplete de bases en la posición 274-276, con referencia al triplete de bases TTG según la SEQ ID NO: 3 que codifica para los primeros aminoácidos de la fosfatasa alcalina altamente activa procedente de animal vacuno (vaca), de TCT en CGT. Adicionalmente, además, se diseñaron los cebadores parcialmente complementarios el uno con respecto al otro, consistentes en los cebadores 5'-S92A, en concordancia con la SEQ ID NO: 14, y 3'-S92A, en concordancia con la SEQ ID NO: 15. Se procedió, a continuación, a iniciar la primera reacción de PCR, con los pares de cebadores 5'hAP y 3'-S92A así como 5'-S92A y 3'-hAP, separados el uno con respecto al otro, con la secuencia genética SEQ ID NO: 3, a modo de iniciador, de tal forma que, la secuencia genética mutante, en primer lugar, se amplificó en dos segmentos. Los segmentos, se analizaron con gel de agarosa, y se aislaron a partir del gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) y, a continuación, se insertaron en la segunda reacción de PCR. En esta segunda reacción de PCR, se fusionaron ambos segmentos, para convertirse en el producto de longitud total, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba. La secuencia genética de esta forma originada, se clonó correspondientemente en concordancia, con los vectores de clonación por PCR (equipo, a modo de "kit", de clonación de PCR, del tipo PCR Cloning Kit-blund end/Roche Diagnostics), y se comprobó, por mediación de análisis de restricción y secuenciación.

Mutagénesis para la generación del mutante individual Gly322Phe

45

Para la generación del mutante individual Gly322Phe, se mutó el triplete de bases en la posición 964-966, con referencia al triplete de bases TTG según la SEQ ID NO: 3 que codifica para los primeros aminoácidos de la fosfatasa alcalina altamente activa procedente de animal vacuno (vaca), de GGT en TTT. Adicionalmente, además, se diseñaron los cebadores parcialmente complementarios el uno con respecto al otro, consistentes en los cebadores 5'-G322F, en concordancia con la SEQ ID NO: 16, y 3'-G322F, en concordancia con la SEQ ID NO: 17. Se procedió, a continuación, a iniciar la primera reacción de PCR, con los pares de cebadores 5'hAP y 3'-G322F así como 5'-G322F y 3'-hAP, separados el uno con respecto al otro, con la secuencia genética según la SEQ ID NO: 3, a modo de iniciador, de tal forma que, la secuencia genética mutante, se amplificó, en primer lugar, en dos segmentos. Los segmentos, se analizaron con gel de agarosa, y se aislaron a partir del gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) y, a continuación, se insertaron en la segunda reacción de PCR. En esta segunda reacción de PCR, se fusionaron ambos segmentos, para convertirse en el producto de longitud total, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba. La secuencia genética de esta forma originada, se clonó correspondientemente en concordancia, con los vectores de clonación por PCR (equipo, a modo de "kit", de clonación de PCR, del tipo PCR Cloning Kit-blund end/Roche Diagnostics), y se comprobó, por mediación de análisis de restricción y secuenciación.

60

Mutagénesis para la generación del mutante doble His320Asn/Gly322Phe

Para la generación del mutante individual His320Asn/Gly322Phe, se mutó el triplete de bases en las posiciones 958-966 y, respectivamente, 954-966, con referencia al triplete de bases TTG según la SEQ ID NO: 3 que codifica para los primeros aminoácidos de la fosfatasa alcalina altamente activa procedente de animal vacuno (vaca), de CAT en AAT y, respectivamente, de GGT en TTT. Adicionalmente, además, se diseñaron los cebadores parcialmente complementarios el uno con respecto al otro, consistentes en los cebadores 5'-H320N/G322F, en concordancia con la SEQ ID

ES 2 337 666 T3

NO: 18, y 3'-H320N/G322F, en concordancia con la SEQ ID NO: 19. Se procedió, a continuación, a iniciar la primera reacción de PCR, con los pares de cebadores 5'-hAP y 3'-H320N/G322F, así como 5'-H320N/G322F y 3'-hAP, separados el uno con respecto al otro, con la secuencia genética según la SEQ ID NO: 3, a modo de iniciador, de tal forma que, la secuencia genética mutante, se amplificó, en primer lugar, en dos segmentos. Los segmentos, se analizaron con gel de agarosa, y se aislaron a partir del gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen) y, a continuación, se insertaron en la segunda reacción de PCR. En esta segunda reacción de PCR, se fusionaron ambos segmentos, para convertirse en el producto de longitud total, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba. La secuencia genética de esta forma originada, se clonó correspondientemente en concordancia, con los vectores de clonación por PCR (equipo, a modo de "kit", de clonación de PCR, del tipo PCR Cloning Kit-blund end/Roche Diagnostics), y se comprobó, por mediación de análisis de restricción y secuenciación.

Generación del mutante triple Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe

Le generación del mutante triple Ser92Ala His320Asn/Gly322Phe, se llevó a cabo mediante la combinación del mutante individual Ser92Ala y del mutante doble His320Asn/Gly322Phe. A continuación, se procedió cortar ambas secuencias genéticas, respectivamente clonadas en vectores de clonación por PCR (equipo, a modo de "kit", de clonación de PCR, del tipo PCR Cloning Kit-blund end/Roche Diagnostics), separadas la una con respecto a la otra, con las endonucleasas de restricción MunI y AspT18, y se separaron del preparado saliente de restricción, mediante electroforesis en agarosa. MunI, corta entre las posiciones de los tripletes procedentes de Ser92 y His320. A partir del mutante individual Ser92Ala, se aisló el fragmento de vector de aproximadamente 3700 pb de longitud, y del mutante doble His320Asn/Gly322Ph3, se aisló el fragmento de aproximadamente 900 pb de longitud, del sector 3' de la secuencia genética mutante, en gel de agarosa, y estos dos fragmentos, se ligaron, en la etapa siguiente, el uno con el otro. La secuencia genética de esta forma producida, se comprobó mediante secuenciación.

Ejemplo 2

Clonación de las secuencias genéticas mutantes en el vector de expresión pPICCZαA, para Pichia pastoris

Las secuencias genéticas comprobadas, se cortaron, mediante restricción, con las endonucleasas de restricción EcoRI y Asp718, de los vectores de clonación por PCR, el conjunto resultante de restricción, se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y, los fragmentos de aproximadamente 1480 pb de longitud, se aislaron del gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen). A continuación, se procedió a ligar las secuencias genéticas mutantes con un fragmento de vector linealizado, también, con EcoRI y Asp718, procedente del vector de expresión pPICCZαA. Los sitios de corte de las endonucleasas de restricción para EcoRI y Asp718, se aportaron a la secuencia genética mutante, mediante el cebador 5'-hAP y, respectivamente, 3'-hAP, que contienen la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción EcoRI y, respectivamente, Asp718, corriente arriba y, respectivamente, corriente debajo de las secuencia codificadora. Los vectores de expresión para los mutantes de fosfatasa alcalina de esta forma originados, se denominaron del siguiente modo: pNaAP31-1 (Ser92Ala), pNaAP4 3-1 (Gly322Phe), pNaAP51-1 (His320Asn/Gly322Phe) y pNaAP6-1 (Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe).

En este vector, las secuencias mutantes, se encuentran bajo el control del promotor de AOX 1 (promotor para la alcoholoxidasa 1 de la *Pichia pastoris*), es inducible con metanol, y se clona, en el correcto marco de lectura, detrás del péptido de señal del factor α de la *Saccharomyces cerevisiae*. El fragmento genético de esta forma obtenido, se comprobó, a continuación, en cuanto a lo referente a una secuencia de bases exenta de errores, mediante análisis de restricción y secuenciación. Los vectores de expresión de esta forma originados, los cuales codifican, respectivamente, a una de las secuencias genéticas según las SEQ ID NO's: 8-11, de los mutantes de fosfatasa alcalina eucariótica, se muestran, a título de ejemplos, en el pNaAP31-1 (véase la figura 1).

Transformación de los vectores de expresión con secuencias genéticas mutantes en Pichia pastoris

Para la transformación de los vectores de expresión con secuencias genéticas mutantes, en *Pichia pastoris* X-35, con una integración subsiguiente en el genoma, se procedió, en primer lugar la linealizar los vectores, con SacI (Roche Diagnostics GmbH). La transformación, se efectuó mediante electroporación, con el impulsor genético Gene Pulser II (Biorad).

Para ello, se procedió a inocular una colonia de la cepa salvaje de *Pichia pastoris* en 5 ml de medio de YPD (YPD-Medium de la firma Invitrogen), y se incubó, a una temperatura de 30°C, durante el transcurso de toda la noche, mediante agitación. El cultivo del transcurso de toda la noche, se sobreinoculó, a continuación, a razón de 1:2000, en 200 ml de medio de YPD (YPD-Medium de la firma Invitrogen), y se incubó, durante el transcurso de tiempo de toda la noche, a una temperatura de 30°C, mediante agitación, hasta que se obtuviera un OD₆₀₀ de 1,3-15. Se procedió a centrifugar las células (1500 x g/5 minutos) y, el gránulo, se resuspendió en 200 ml de agua helada (°) estéril. Se procedió a centrifugar las células de nuevo (1500 x g/5 minutos), y se resuspendieron en 100 ml de agua helada (°) estéril. Las células, se centrifugaron otra vez, de nuevo y se resuspendieron en 10 ml de Sorbitol ICN) 1M, helado. Las células, se centrifugaron otra vez, de nuevo y se resuspendieron en 0,5 ml de Sorbitol ICN) 1M, helado. Las células de este modo obtenidas, se mantuvieron en hielo, y se aplicaron, enseguida, para la transformación.

ES 2 337 666 T3

Se procedió a mezclar 80 μg de las células con aproximadamente 1 μg del DNA del vector de expresión linealizado y, la preparación, en su totalidad, se transfirió al interior de una cubeta de electroporación helada (0°), y se incubó durante un transcurso de tiempo adicional de 5 minutos, sobre hielo. A continuación, se procedió a transferir la cubeta al interior del impulsor genético Gene Pulser II (Biorad) y, la transformación, se realizó a 1 kV, $1\text{k}\Omega$ y $25\mu\text{F}$. Después de la electroporación, la preparación, se mezcló con 1 ml de Sorbitol 1M (ICN) y, a continuación, se colocaron de 100 a 150 μl sobre una placa de Agar de YPDS (Invitrogen) con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Zeocin[®] (Invitrogen). Las placas, se incubaron, a continuación, durante un transcurso de tiempo de 2-4 días, a una temperatura de 30°C .

Los clones, se sobreinocularon sobre placas de MD de retículo (MD = Dextrosa mínima), y se analizaron adicionalmente. Los clones desarrollados, se recolectaron, se resuspendieron en 20 μl de agua estéril, y se disgregaron con 17,5 U de Lyticase (lítica procedente de la firma Roche Diagnostics GmbH) (durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 37°C), y se procedió, directamente, a su análisis, mediante PCR, en cuanto a lo referente a la correcta integración de la casete de expansión, con la correspondiente secuencia genética mutada.

Los clones, los cuales habían integrado el casete de expresión completo en el genoma, se aplicaron, a continuación, en los ensayos de expresión.

Ejemplo 3

Expresión de los mutantes de fosfatasa alcalina

Se procedió a inocular los clones positivos, en 3 ml de medio del tipo BMGY-Medium (de la firma Invitrogen), y se procedió a incubarlos, durante el transcurso de toda, la noche, y a una temperatura de 30°C , bajo régimen de agitación. A continuación, se procedió a determinar el valor de OD a 600 nm, y así, de este modo, se sobreinocularon en 10 ml de medio del tipo BMMY-Medium (de la firma Invitrogen), de tal modo que resultase un valor de OD₆₀₀ de 1. El medio del tipo BMMY-Medium (de la firma Invitrogen), contiene metanol (Mallinckrodt Baker B.V.), el cual induce la expresión de los mutantes de fosfatasa alcalina, sobre el Promotor AOX-1.

Las retortas de agitación, se incubaron, a una temperatura de 30°C , bajo régimen de agitación, y se extrajeron muestras cada 24 horas, se determinó el valor de OD₆₀₀, se realizó un test de ensayo de actividad en cuanto a la expresión de los mutantes de fosfatasa alcalina, y respectivamente, con un porcentaje del 0,5% de metanol (de la firma Mallinckrodt Backer B.V.), se condujeron a una inducción subsiguiente. Los ensayo de expresión, transcurrieron durante un período de tiempo de 96 horas.

Ejemplo 4

Test de ensayo de actividad de los mutantes de fosfatasa alcalina

Se extrajeron, respectivamente, 500 μl del cultivo de expresión en concordancia con el ejemplo 3, se procedió a determinar el valor de OD₆₀₀ y se centrifugaron las células. Se conservó el sobrenadante (sobrante) y, el gránulo de células, se volvió a suspender en una cantidad de Y-PER[®] (50 a 300 $\mu\text{l}/\text{Pierce}$), para la lisis, y se agitó, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a la temperatura ambiente. A continuación, se procedió a centrifugar el lisado (1500 x g/5 minutos), para la separación de los residuos de células y, el sobrenadante (sobrante), se condujo a recipientes de reacción frescos. Se procedió, a continuación, a aplicar los lisados en tests de ensayo de actividad.

El test de ensayo de actividad, funciona según el siguiente principio:

AP



Se mide el aumento de la de absorción a 405 nm.

Se procede a mezclar 3 ml de tampón de dietanolamina (1 mol/l Dietanolamina -(Merck) -, pH 9,8, 0,5 mmol/l MgCl_2 (Riedel de Haen), con 50 μl de solución fosfato de 4-nitrofenilo (0,67 mol/l fosfato de 4-nitrofenilo), sal de Na (Roche diagnostics GmbH) y, la preparación, se atempera a una temperatura de 37°C . A continuación, la reacción, se inicia mediante la adición de 5 μl de lisado, y se determina la variación de la absorción, a una temperatura de 37°C , durante un transcurso de tiempo de 3 minutos, y, a partir de ello, se calcula el valor de $\Delta\text{E}/\text{minuto}$.

ES 2 337 666 T3

La actividad, se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{3,10}{\epsilon \times 0,005 \times 1} \times \Delta E/\text{min.} \times \frac{1}{\text{Factor} \times} \quad (\text{U/ml solución de mezcla})$$

$$\epsilon = 18,2 [1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

Factor x = factor de concentración después de la disgregación de células

De una forma análoga, se procedió a determinar la actividad a partir del sobrenadante o sobrante del medio del cultivo de expresión. Aquí, igualmente, se procedió a iniciar la reacción con 50 μl de sobrenadante, si bien, no obstante, se añadieron, adicionalmente, todavía 0,5 mM ZnCl_2 . El cálculo, aconteció, no obstante, sin el factor x.

Como controles positivos, se acarrearon respectivamente sobrenadantes o sobrantes de clones, los cuales expresan la fosfatasa alcalina de alta actividad, según la SEQ ID NO: 3, y como clones negativos, los que se habían transformado únicamente con el vector de partida pPICZ α A, sin gen diana.

Con este test de ensayo de la actividad, se procedió a determinar la actividad residual de los mutantes, de la siguiente forma:

Mutante individual Ser92Ala: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 5000

Mutante individual Gly322Phe: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 2500

Mutante doble His320Asn/Gly322Phe: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 10000 (cerca del límite de comprobación)

Mutante triple Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 10000 (cerca del límite de comprobación)

Mutante triple Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 1000 (cerca del límite de comprobación)

Mutante triple Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe: Reducción de la actividad específica en un factor de aproximadamente 1000 (cerca del límite de comprobación)

Comprobación de la expresión de los mutantes de AP, por mediación de transferencia de Western

Se procedió a aplicar 10 μl de sobrenadante (sobrante) no concentrado o, respectivamente, extracto crudo, después de la disgregación de las células, a un gel de SDS al 10% (Novex Pre-Cast Gel/Invitrogen) y, la proteína las proteínas que se encuentran en su interior, se separaron mediante la aplicación de un campo eléctrico, en concordancia con la magnitud. Las proteínas de esta forma separadas, se sometieron a transferencia de Western, sobre una membrana de nitrocelulosa (aparato de transferencia de Western del tipo Novex® Western transfer Apparatus XCell II® Blot Module/Invitrogen). La membrana, se lavó, después de la transferencia, dos veces, con agua ultrapurificada, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos y, a continuación, se sometió a régimen de agitación, en 10 ml de solución de bloqueo (Blocking Solution, de la firma Invitrogen), durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A continuación, se procedió, de nuevo, a lavar la membrana, con 20 ml de agua ultrapurificada, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos y, después de ello, en 10 ml de solución de bloqueo (Blocking Solution, de la firma Invitrogen), la cual contenía, esta vez, anticuerpo 1 (anticuerpo 1 del tipo Anti AP-rabbit (Rockland Inc, que se encuentra diluido en un valor de 1:5000, a partir de una solución de la cepa correspondiente a 10 mg/ml), durante un transcurso de tiempo de 1 hora. Después de ello, se procedió a lavar con 20 ml de una solución de lavado de anticuerpo (del tipo Antikörperwaschlösung de la firma Invitrogen) durante, respectivamente, un transcurso de tiempo de 5 minutos y, a continuación, la membrana, se incubó con 10 ml de la solución de anticuerpo secundaria (la cual contiene el anticuerpo Anti-Rabbit-antikörper/Invitrogen), durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se continúa, otra vez, con un lavado, de cuatro veces, durante respectivamente, un transcurso de tiempo de 5 minutos, con 20 ml de una solución de lavado de anticuerpo (del tipo Antikörperwaschlösung de la firma Invitrogen), y un lavado de tres veces, con 20 ml de agua ultrapurificada, durante, respectivamente, un transcurso de tiempo de 2 minutos. Para la tinción, se procedió, a continuación, a incubar la membrana, en 5 ml de una solución de tinción, (substrato cromógeno/Invitrogen) durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1-60 minutos. El tiempo de incubación, se rige por la calidad de la tinción. Después de la tinción óptima, se procede a lavar la membrana, tres veces, con 20 ml de agua ultrapurificada, durante respectivamente un transcurso de tiempo de 2 minutos y, a continuación, se procede a secar la membrana, a la temperatura ambiente. La totalidad de las soluciones, con la excepción del agua

ultrapurificada, procedían del equipo de inmunodetección, a modo de “kit”, del tipo Western Breeze Chromogenic Immunodetection Kit, de la firma Invitrogen, y todas las etapas de incubación, se realizaron a la temperatura ambiente. La realización, se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

5

Ejemplo 6

Aumento de la capacidad de expresión mediante transformación múltiple

10 Se procedió, otra vez, a preparar los mejores clones procedentes de los ensayos de expresión, para la electroporación, de la misma forma que la que se ha descrito en el ejemplo 2, y se procedió, otra vez, a transformarlos con 1 μ g del vector-DNA del vector de expresión, linealizado y, el preparado de transformación, se colocó sobre placas de Agar de YPDS (Invitrogen) con 1000 a 2000 μ g/ml de Zeocin[®] (Invitrogen). A continuación, se procede a aumentar la presión de selección, que sólo puedan hacer crecer clones, los cuales hayan integrado, en el genoma, múltiples copias
15 del vector de expresión y, así, con ello, también, varias copias del respectivo gen de resistencia (aquí, en este caso, Zeocin[®]). La proteína de resistencia consistente en Zeocin[®], es el producto del gen de la bleomicina de la *Streptoalloeus hindustanos* (Chalmers, T. *et al.*, Curr. Genet. 20 (1991), 301-314; Drocour, D. *et al.*, Nucleic Acid Research 18 (1990), 4009), el cual enlaza a la Zeocin[®], en una proporción estequiométrica de concentración y, así, con ello, confiere la resistencia de las células contra la Zeocin[®]. Cuanto mayor es la concentración en Zeocin[®], en las placas de agar de YDPS, más proteína de resistencia debe originar la célula, con objeto de enlazar a la Zeocin[®], de una forma
20 cuantitativa y, así, con ello, posibilitar un crecimiento. Esto es posible, entre otras cosas, si se integran múltiples copias del gen de resistencia, en el genoma. Los clones, se sobreinocularon, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba, con Placas de MD de retículo, y se comprobaron, de nuevo, mediante análisis de PCR, en cuanto a lo referente a los respectivos casetes de expresión. A continuación, se procedió, otra vez, a someter los clones a tests de ensayo, de
25 la forma que se ha descrito en los ejemplos 4 y 5, en cuanto a lo referente a actividad de AP, respectivamente, mediante análisis de transferencia de Western.

Ejemplo 7

30

Aumento de la capacidad de expresión mediante la utilización de una segunda presión de selección

Un aumento de la concentración de Zeocin[®], por encima de los 200 μ g/ml, no condujo a una capacidad de expresión mejorada de los mutantes de fosfatasa alcalina. Con objeto aumentar adicionalmente el número de copias de genes del gen según las SEQ ID NO's: 8-11, que codifican para los mutantes de fosfatasa alcalina, y que están optimizados para la expresión, en el codón de levadura, en los clones de expresión, se procedió a seleccionar los clones de expresión con la mayor capacidad de expresión, sobre una segunda presión de selección, de una forma preferible, G418 (Roche Diagnostics GmbH). Con esta finalidad, se procedió a aislar el casete de expresión completo, a partir del pNAP31-1, que consta del promotor AOX1, péptido de señal de factor α de la *Saccharomyces cerevisiae*, gen optimizado con
40 codones, para los mutantes de fosfatasa alcalina en concordancia con las SEQ ID NO's: 8-11 y región de terminación de transcripción de AOX1, a través de PCR, mediante los respectivos cebadores seleccionados de AOX1 y, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba, se clonó en el vector pP1C9K, cuya integración en el genoma de *Pichia pastoris*, se selecciona por mediación del G418 (Roche Diagnostics GmbH). En el caso de los cebadores 5'-Expr 3'-Expr, se trata de las secuencias SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

45

Se procedió a analizar la preparación resultante de PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa, se aisló el fragmento genético con el tamaño esperado (mediante un equipo, a modo de “Kit”, del tipo QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen), se cortó posteriormente con SacI y NotI (Roche Diagnostics GmbH) y, a continuación, se aisló, de nuevo, a partir del gel de agarosa (mediante un equipo, a modo de “Kit”, del tipo QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen), y
50 se ligó en un fragmento de vector, de PIC9K, igualmente linealizado y aislado, con SacI y NotI (Roche Diagnostics GmbH). Así, de este modo, se garantizó el hecho de que, el casete de expresión en su totalidad, de los respectivos vectores de expresión, se encontraran, en el pPIC9K, de una forma idéntica. El fragmento insertado, se comprobó por mediación de análisis de restricción y secuenciación, con las regiones flanqueantes. Los vectores de expresión para los mutantes de fosfatasa alcalina de esta forma originados, se denominaron del siguiente modo: pNaAP31-2 (Ser92Ala),
55 pNaAP 4 3-2 (Gly322Phe), pNaAP51-2 (His320Asn/Gly322Phe) y pNaAP6-2 (Ser92Ala/His320Asn/Gly322Phe).

Se procedió a preparar los clones con la mayor capacidad de expresión de los mutantes de AP, de la transformación múltiple, con Zeocin[®], como marcador de selección, de la misma forma que se ha descrito en el ejemplo 2, para la electroporación y, se transformaron con 1 μ g de fragmento de pNaAP-31-2 y derivados, linealizados con SacI (Roche Diagnostics GmbH), de la misma forma que se ha descrito para el ejemplo 2. El preparado de transformación, se conservó, a continuación, durante un transcurso de tiempo de 1 a 3 días, a una temperatura de 4°C, en sorbitol 1 M (ICN) (para la formación o desarrollo del gen de resistencia G418) y, a continuación, se depositaron de 100 a 200 μ l sobre pacas de YPD (Invitrogen), con 1,2 ó respectivamente, 4 mg/ml de G418 (Roche Diagnostics GmbH) y se incubaron durante un transcurso de tiempo de 3 a 5 días, a una temperatura de 30°C. Los clones resultantes de ello,
65 se analizaron, de nuevo, de la misma forma que se ha descrito, en un test de actividad, en cuanto a lo referente a una expresión incrementada de los mutantes eucarióticos de fosfatasa alcalina.

REIVINDICACIONES

1. Mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, en donde,

- la frecuencia a mutar, es la SEQ ID NO:2, y

- el mutante, presenta una actividad reducida como mínimo en un factor de 100, en comparación con la del tipo salvaje,

el mutante, presente una o varias de las mutaciones que se citan a continuación, y en donde, la posición de la mutación, se encuentra definida con relación a la SEQ ID NO: 2:

Ser92: por Ala ó Gly

His320: por Asn ó Phe

Gly 322: por Phe ó Lys.

2. Mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, según la reivindicación 1, en donde, la enzima, según la secuencia del tipo salvaje, presenta una actividad específica correspondiente a un valor por encima de 7000 U/mg.

3. Mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, según una de las reivindicaciones 1 y 2, en donde, los mutantes, presentan una actividad disminuida en por lo menos un factor de 1000, en comparación con la secuencia del tipo salvaje.

4. Mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, los mutantes, presentan una actividad disminuida en por lo menos un factor de 10000, en comparación con la secuencia del tipo salvaje.

5. Mutantes de la fosfatasa alcalina eucariótica, según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, estos mutantes, presentan una secuencia de aminoácidos, la cual se selecciona de entre las SEQ IC NO's: 4-7.

6. DNA recombinante, que codifica a un mutante de la fosfatasa alcalina eucariótica, según una de las reivindicaciones 1-5.

7. DNA recombinante, que codifica a un mutante de la fosfatasa alcalina eucariótica, en donde, este mutante, presenta una secuencia de ácido nucleico, la cual se elige entre las SEQ ID NO's: 8-11.

8. Vector que contiene una secuencia de ácido nucleico, la cual se elige entre las SEQ ID NO's: 8-11.

9. Vector, según la reivindicación 8, la cual corresponde a un vector, el cual se elige de entre los siguientes vectores: pPICZ α A, B, C; pPICZ, pPICZ-E, pPICZ α -E; pPIC6, pPIC6 α A, B, C; pGAPZ, pGAPZ α A, B, C; pPIC9; pPIC9K, pPIC3.5, pPIC3.5K, pAO815, pMET, pMET α A, B, C; pYES-Dest52, pYES2,1/V5-His-TOPO, pYC2-E, pYES2.1-E; vectores Yes, pTEF1/Zeo, pTEF1/Bsd, pNMT-TOPO.

10. Cepa huésped, transformada con un vector según la reivindicación 8 ó 9.

11. Cepa huésped, según la reivindicación 10, en donde, como cepa huésped, se utiliza la *Pichia pastoris*.

12. Procedimiento para la fabricación de un mutante de la fosfatasa alcalina eucariótica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 5, en células de levadura, que comprende las etapas de: a) clonación de una secuencia genética según la reivindicación 6 ó 7, en distintos vectores, b) transformación de la levadura, c) expresión de los mutantes de AP, y d) purificación de la fosfatasa alcalina, **caracterizado** por el hecho de que,

- un primer vector, presenta un gen de resistencia, contra un primer marcador de selección,

- los transformantes, los cuales han integrado el gen de resistencia y la secuencia genética deseada, en el genoma, se seleccionan, mediante el crecimiento sobre un medio nutritivo, con una reducida concentración del primer marcador de selección.

- el número de copias genéticas, se aumenta mediante transformación múltiple, a cuyo efecto, las transformaciones múltiples, se seleccionan, mediante el crecimiento sobre un medio nutritivo, con presión de selección elevada,

- se añade un segundo vector, el cual presenta un gen de resistencia contra un segundo marcador de selección,

ES 2 337 666 T3

- el número de copias genéticas, se aumenta mediante transformación múltiple con el segundo vector, a cuyo efecto, los transformantes múltiples, se seleccionan mediante crecimiento sobre el medio nutritivo, con una presión de selección elevada, y

- 5 - se seleccionan aquéllos clones, los cuales han integrado, al genoma, varias copias de la secuencia genética y genes de resistencia al marcador de selección.

13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en donde se utilizan células de levadura metilotrofas.

10

14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en donde, como célula de levadura metilotrofa, se utiliza la *Pichia Pastoris*.

15

15. Procedimiento, según una de las reivindicaciones 12-14, en donde, como vector, se utiliza uno de tal tipo que corresponda a un vector, el cual se elige de entre el siguiente grupo de vectores: pPICZ α A, B, C; pPICZ, pPICZ-E, pPICZ α -E; pPIC6, pPIC6 α A, B, C; pGAPZ, pGAPZ α A, B, C; pPIC9; pPIC9K, pPIC3.5, pPIC3.5K, pAO815.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

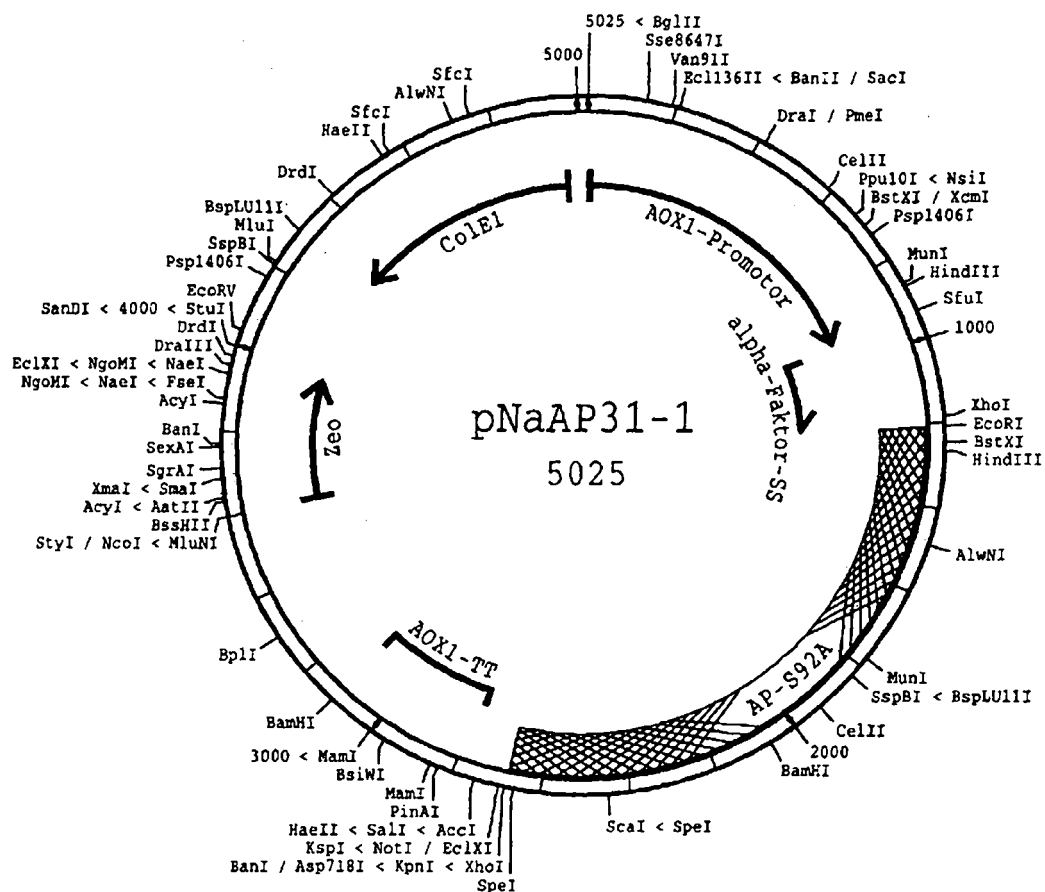


Figura 1

Mapa de plásmido del vector de expresión pNaAP31-1, el cual contiene el gen para el mutante individual de la fosfatasa alcalina Ser92Ala. El pNaAP31-1, se representa, a modo de ejemplo, para los restantes vectores de expresión pNaAP43-1, pNaAP51-1, y pNaAP6-1.

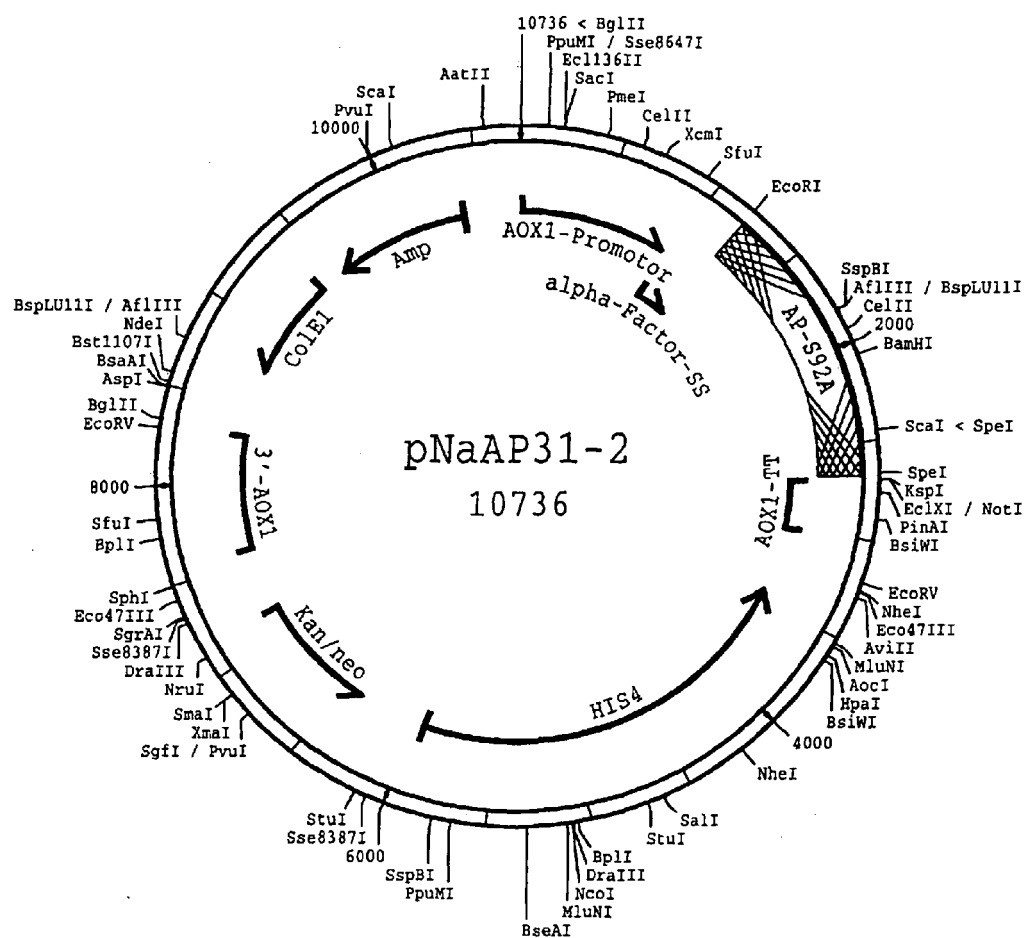


Figura 2

Mapa de plásmido del vector de expresión pNaAP31-2, el cual contiene el gen para el mutante individual de la fosfatasa alcalina Ser92Ala. El pNaAP31-1, se representa, a modo de ejemplo, para los restantes vectores de expresión pNaAP43-2, pNaAP51-2, y pNaAP6-2.

ES 2 337 666 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
 <120> Elaboración de mutantes de una fosfatasa alcalina, inactivos o de reducida actividad y su expresión en levadura.
 <130> W 21227 DE
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1464
 <212> DNA
 <213> Bovino
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1464)
 <223>
 <400> 1

25	ctc atc cca gct gag gag gaa aac ccc gcc ttc tgg aac cgc cag gca	48
	Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala	
	1 5 10 15	
30	gcc cag gcc ctt gat gta gcc aag aag ttg cag ccg atc cag aca gct	96
	Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala	
	20 25 30	
35	gcc aag aat gtc atc ctc ttc ttg ggg gat ggg atg ggg gtg cct acg	144
	Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr	
	35 40 45	
40	gtg aca gcc act cgg atc cta aag ggg cag atg aat ggc aaa ctg gga	192
	Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly	
	50 55 60	
45	cct gag aca ccc ctg gcc atg gac cag ttc cca tac gtg gct ctg tcc	240
	Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser	
	65 70 75 80	
50	aag aca tac aac gtg gac aga cag gtg cca gac agc gca ggc act gcc	288
	Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly Thr Ala	
	85 90 95	

ES 2 337 666 T3

	act gcc tac ctg tgt ggg gtc aag ggc aac tac aga acc atc ggt gta	336
	Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Tyr Arg Thr Ile Gly Val	
	100 105 110	
5	agt gca gcc gcc cgc tac aat cag tgc aac acg aca cgt ggg aat gag	384
	Ser Ala Ala Ala Arg Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu	
	115 120 125	
10	gtc acg tct gtg atc aac cgg gcc aag aaa gca ggg aag gcc gtg gga	432
	Val Thr Ser Val Ile Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala Val Gly	
	130 135 140	
15	gtg gtg acc acc acc agg gtg cag cat gcc tcc cca gcc ggg gcc tac	480
	Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Ala Tyr	
	145 150 155 160	
20	gcg cac acg gtg aac cga aac tgg tac tca gac gcc gac ctg cct gct	528
	Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Leu Pro Ala	
	165 170 175	
25	gat gca cag aag aat ggc tgc cag gac atc gcc gca cag ctg gtc tac	576
	Asp Ala Gln Lys Asn Gly Cys Gln Asp Ile Ala Ala Gln Leu Val Tyr	
	180 185 190	
30	aac atg gat att gac gtg atc ctg ggt gga ggc cga atg tac atg ttt	624
	Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Met Tyr Met Phe	
	195 200 205	
35	cct gag ggg acc cca gac cct gaa tac cca gat gat gcc agt gtg aat	672
	Pro Glu Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Ala Ser Val Asn	
	210 215 220	
40	gga gtc cgg aag gac aag cag aac ctg gtg cag gaa tgg cag gcc aag	720
	Gly Val Arg Lys Asp Lys Gln Asn Leu Val Gln Glu Trp Gln Ala Lys	
	225 230 235 240	
45	cac cag gga gcc cag tat gtg tgg aac cgc act gcg ctc ctt cag gcg	768
	His Gln Gly Ala Gln Tyr Val Trp Asn Arg Thr Ala Leu Leu Gln Ala	
	245 250 255	
50	gcc gat gac tcc agt gta aca cac ctc atg ggc ctc ttt gag ccg gca	816
	Ala Asp Asp Ser Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Ala	
	260 265 270	
55	gac atg aag tat aat gtt cag caa gac cac acc aag gac ccg acc ctg	864
	Asp Met Lys Tyr Asn Val Gln Gln Asp His Thr Lys Asp Pro Thr Leu	
	275 280 285	
60	gcg gag atg acg gag gcg gcc ctg caa gtg ctg agc agg aac ccc cgg	912
	Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg	
	290 295 300	
65	ggc ttc tac ctc ttc gtg gag gga ggc cgc att gac cac ggt cac cat	960
	Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His	
	305 310 315 320	

ES 2 337 666 T3

	gac ggc aaa gct tat atg gca ctg act gag gcg atc atg ttt gac aat	1008
	Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn	
	325 330 335	
5	gcc atc gcc aag gct aac gag ctc act agc gaa ctg gac acg ctg atc	1056
	Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile	
	340 345 350	
10	ctt gtc act gca gac cac tcc cat gtc ttc tct ttt ggt ggc tac aca	1104
	Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr	
	355 360 365	
15	ctg cgt ggg acc tcc att ttc ggt ctg gcc ccc ggc aag gcc tta gac	1152
	Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp	
	370 375 380	
20	agc aag tcc tac acc tcc atc ctc tat ggc aat ggc cca ggc tat gcg	1200
	Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala	
	385 390 395 400	
25	ctt ggc ggg ggc tcc agg ccc gat gtt aat ggc agc aca agc gag gaa	1248
	Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu	
	405 410 415	
30	ccc tca tac cgg cag cag gcg gcc gtg ccc ctg gct agc gag acc cac	1296
	Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His	
	420 425 430	
35	ggg ggc gaa gac gtg gcg gtg ttc gcg cga ggc ccg cag gcg cac ctg	1344
	Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu	
	435 440 445	
40	gtg cac ggc gtg cag gag gag acc ttc gtg gcg cac atc atg gcc ttt	1392
	Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe	
	450 455 460	
45	gcg ggc tgc gtg gag ccc tac acc gac tgc aat ctg cca gcc ccc gcc	1440
	Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala	
	465 470 475 480	
50	acc gcc acc agc atc ccc gac tag	1464
	Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp	
	485	

50 <210> 2
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Bovino

55

60

65

ES 2 337 666 T3

<400> 2

5	Leu	Ile	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Ala	Phe	Trp	Asn	Arg	Gln	Ala	1	5	10	15
10	Ala	Gln	Ala	Leu	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ile	Gln	Thr	Ala	20	25	30	
15	Ala	Lys	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Pro	Thr	35	40	45	
20	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Met	Asn	Gly	Lys	Leu	Gly	50	55	60	
25	Pro	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Gln	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	65	70	75	80
30	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Arg	Gln	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	85	90	95	
35	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	100	105	110	
40	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	115	120	125	
45	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	130	135	140	
50	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Tyr	145	150	155	160
55	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	165	170	175	
60	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Tyr	180	185	190	
65	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Met	Phe	195	200	205	
70	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	210	215	220	
75	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Gln	Ala	Lys	225	230	235	240
80	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	245	250	255	
85	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Ala	260	265	270	
90	Asp	Met	Lys	Tyr	Asn	Val	Gln	Gln	Asp	His	Thr	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	275	280	285	

ES 2 337 666 T3

Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg
 290 295 300

5 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His
 305 310 315 320

10 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335

15 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350

20 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365

25 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380

30 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400

35 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415

40 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430

45 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445

50 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460

55 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480

Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485

50 <210> 3

<211> 1476

<212> DNA

<213> Ácido nucleico

55 <400> 3

60 gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagctttttt ggaatagaca agctgctcaa 60

gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tggtatttttg 120

tttttgggtg atggtatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggtcaa 180

65

ES 2 337 666 T3

	atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct	240
	ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctgggtac tgctactgct	300
5	tacttggtg gtgtaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac	360
	aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag	420
10	gctggtaagg ctgttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggt	480
	gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct	540
15	caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatggt	600
	atdddgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca	660
	gatgatgctt ctgttaatgg tgtagaaaag gataagcaaa atttggttca agaatggcaa	720
20	gctaagcatc aagggtgctca atatgtdttg aatagaactg ctttggttga agctgctgat	780
	gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatggt	840
25	caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt	900
	ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttggtgaag gtggtagaat tgatcatggt	960
30	catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtdtga taatgctatt	1020
	gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat	1080
	agtcattgtt tttcttttgg tgggtacact ttgagaggta cttctatddd tggtdttggct	1140
35	ccaggtaagg ctttggtatg taagtcttac acttctattd tgtatggtaa tggtdccagg	1200
	tatgcttdtg gtggtggttc tagaccagat gtdaatggta gtactagtga agaaccatct	1260
40	tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atggtggtga agatgtdgct	1320
	gttdttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatggtg ttcaagaaga aacttdttgt	1380
	gctcatatta tggcttdtgc tggtdtggtt gaaccataca ctgattgtaa tttgcccagct	1440
45	ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc	1476

50 <210> 4
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Bovino/mutado

55

60

65

ES 2 337 666 T3

<400> 4

5	Leu	Ile	Pro	Ala	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Ala	Phe	Trp	Asn	Arg	Gln	Ala	1	5	10	15
	Ala	Gln	Ala	Leu	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ile	Gln	Thr	Ala	20	25	30	
10	Ala	Lys	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Pro	Thr	35	40	45	
15	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Met	Asn	Gly	Lys	Leu	Gly	50	55	60	
	Pro	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Gln	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	65	70	75	80
20	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Arg	Gln	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	85	90	95	
25	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	100	105	110	
	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	115	120	125	
30	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	130	135	140	
35	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Tyr	145	150	155	160
	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	165	170	175	
40	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Tyr	180	185	190	
45	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Met	Phe	195	200	205	
	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	210	215	220	
50	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Gln	Ala	Lys	225	230	235	240
55	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	245	250	255	
	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Ala	260	265	270	
60	Asp	Met	Lys	Tyr	Asn	Val	Gln	Gln	Asp	His	Thr	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	275	280	285	

ES 2 337 666 T3

Ala Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Gln Val Leu Ser Arg Asn Pro Arg
 290 295 300

5 Gly Phe Tyr Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His
 305 310 315 320

10 Asp Gly Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335

Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350

15 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365

20 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380

Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400

25 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415

30 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430

Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445

35 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460

40 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480

45 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485

<210> 5

<211> 487

<212> PRT

<213> Bovino/mutado

<400> 5

Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
 1 5 10 15

60 Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala
 20 25 30

65

ES 2 337 666 T3

	Ala	Lys	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Pro	Thr	
			35					40					45				
5	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Met	Asn	Gly	Lys	Leu	Gly	
		50					55					60					
10	Pro	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Gln	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	
	65					70					75					80	
	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Arg	Gln	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	
				85					90						95		
15	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	
				100					105					110			
20	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	
			115					120					125				
	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	
25							135					140					
	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Tyr	
	145					150					155					160	
30	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	
					165					170					175		
	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Tyr	
35				180				185						190			
	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Met	Phe	
40			195					200					205				
	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	
		210					215					220					
45	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Gln	Ala	Lys	
	225					230					235					240	
	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	
50					245					250					255		
	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Ala	
				260					265					270			
55	Asp	Met	Lys	Tyr	Asn	Val	Gln	Gln	Asp	His	Thr	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	
			275					280					285				
	Ala	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	Arg	
60			290				295					300					
	Gly	Phe	Tyr	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	His	
65					310						315				320		

ES 2 337 666 T3

Asp Phe Lys Ala Tyr Met Ala Leu Thr Glu Ala Ile Met Phe Asp Asn
 325 330 335
 5 Ala Ile Ala Lys Ala Asn Glu Leu Thr Ser Glu Leu Asp Thr Leu Ile
 340 345 350
 10 Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365
 15 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380
 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400
 20 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415
 25 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430
 30 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460
 35 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480
 40 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485
 <210> 6
 45 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Bovino/mutado
 50 <400> 6
 55 Leu Ile Pro Ala Glu Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala
 20 25 30
 60 Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr
 35 40 45
 65 Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly
 50 55 60

ES 2 337 666 T3

	Pro	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Gln	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser	
	65					70					75					80	
5	Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Arg	Gln	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	
				85						90					95		
10	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	
				100					105					110			
15	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	
			115					120					125				
20	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	
		130					135					140					
25	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Tyr	
	145					150					155					160	
30	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	
				165						170					175		
35	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Tyr	
			180					185					190				
40	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Met	Phe	
		195						200					205				
45	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	
		210					215					220					
50	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Gln	Ala	Lys	
	225					230					235					240	
55	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	
				245					250						255		
60	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Ala	
			260						265					270			
65	Asp	Met	Lys	Tyr	Asn	Val	Gln	Gln	Asp	His	Thr	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	
		275						280					285				
70	Ala	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	Arg	
		290					295					300					
75	Gly	Phe	Tyr	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	Asn	
	305				310						315					320	
80	Asp	Phe	Lys	Ala	Tyr	Met	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Met	Phe	Asp	Asn	
				325						330				335			
85	Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Asn	Glu	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	
				340					345					350			

ES 2 337 666 T3

Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Thr
 355 360 365
 5 Leu Arg Gly Thr Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Leu Asp
 370 375 380
 10 Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
 385 390 395 400
 15 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
 405 410 415
 20 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
 420 425 430
 25 Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
 450 455 460
 30 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
 465 470 475 480
 Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
 485
 <210> 7
 35 <211> 487
 <212> PRT
 <213> Bovino/mutado
 40 <400> 7
 45 Leu Ile Pro Ala Glu Glu Asn Pro Ala Phe Trp Asn Arg Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Leu Asp Val Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ile Gln Thr Ala
 20 25 30
 50 Ala Lys Asn Val Ile Leu Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Pro Thr
 35 40 45
 55 Val Thr Ala Thr Arg Ile Leu Lys Gly Gln Met Asn Gly Lys Leu Gly
 50 55 60
 60 Pro Glu Thr Pro Leu Ala Met Asp Gln Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser
 65 70 75 80
 Lys Thr Tyr Asn Val Asp Arg Gln Val Pro Asp Ala Ala Gly Thr Ala
 85 90 95
 65

ES 2 337 666 T3

	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ile	Gly	Val	
				100					105					110			
5	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu	
			115					120					125				
10	Val	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	
		130					135					140					
15	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Tyr	
	145					150					155					160	
20	Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	
				165					170					175			
25	Asp	Ala	Gln	Lys	Asn	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Tyr	
			180					185					190				
30	Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Met	Phe	
		195					200					205					
35	Pro	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asn	
		210				215					220						
40	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Gln	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Gln	Ala	Lys	
	225				230						235					240	
45	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	
				245					250						255		
50	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Ala	
			260						265				270				
55	Asp	Met	Lys	Tyr	Asn	Val	Gln	Gln	Asp	His	Thr	Lys	Asp	Pro	Thr	Leu	
		275					280					285					
60	Ala	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	Arg	
		290				295					300						
65	Gly	Phe	Tyr	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	Asn	
	305				310					315						320	
70	Asp	Phe	Lys	Ala	Tyr	Met	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Met	Phe	Asp	Asn	
			325						330				335				
75	Ala	Ile	Ala	Lys	Ala	Asn	Glu	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	
			340					345					350				
80	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Tyr	Thr	
			355				360						365				
85	Leu	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Asp	
		370				375					380						

ES 2 337 666 T3

Ser Lys Ser Tyr Thr Ser Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Ala
385 390 395 400

5 Leu Gly Gly Gly Ser Arg Pro Asp Val Asn Gly Ser Thr Ser Glu Glu
405 410 415

10 Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Ala Ala Val Pro Leu Ala Ser Glu Thr His
420 425 430

Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
435 440 445

15 Val His Gly Val Gln Glu Glu Thr Phe Val Ala His Ile Met Ala Phe
450 455 460

20 Ala Gly Cys Val Glu Pro Tyr Thr Asp Cys Asn Leu Pro Ala Pro Ala
465 470 475 480

Thr Ala Thr Ser Ile Pro Asp
485

25

<210> 8

<211> 1476

30 <212> DNA

<213> Ácido nucleico

<400> 8

35

gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgctcaa 60

40 gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tgttatatttg 120

tttttgggtg atggtatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggtcaa 180

atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct 240

45 ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatg ctgctggtac tgctactgct 300

tacttgtgtg gtgttaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac 360

50 aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag 420

gctggtaagg ctgttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggt 480

gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct 540

55 caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatggt 600

atthtgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca 660

60 gatgatgctt ctgttaatgg tgtagaaag gataagcaaa atttggttca agaatggcaa 720

65

ES 2 337 666 T3

	gctaagcatc aaggtgctca atatgttttg aatagaactg ctttgttgca agctgctgat	780
	gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatggt	840
5	caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt	900
	ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggt	960
10	catcatgatg gtaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt	1020
	gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttggttac tgctgatcat	1080
15	agtcattgtt tttcttttgg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tggtttggct	1140
	ccaggtaagg ctttgatag taagtcttac acttctattt tgtatggtaa tgggtccagg	1200
	tatgctttgg gtgggtggtc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct	1260
20	tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atgggtgtga agatgttgct	1320
	gtttttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatggtg ttcaagaaga aacttttgtt	1380
25	gctcatatta tggcttttgc tggttgtgtt gaaccatata ctgattgtaa tttgccagct	1440
	ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc	1476
30	<210> 9	
	<211> 1476	
	<212> DNA	
35	<213> Ácido nucleico	
	<400> 9	
40	gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagcttttt ggaatagaca agctgctcaa	60
	gctttggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tgttattttg	120
45	tttttgggtg atggatatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaagggtcaa	180
	atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaatttcc atacgttgct	240
50	ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatt ctgctggtac tgctactgct	300
	tacttgtgtg gtgttaaggg taattacaga actattggtg tttctgctgc tgctagatac	360
	aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttacttctg ttattaatag agctaagaag	420
55	gctggtaagg ctggtggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctgg	480
	gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct	540
60	caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatggt	600

65

ES 2 337 666 T3

	at t t t t g g g t g g t g g t a g a a t g t a c a t g t t t c c a g a a g g t a c t c c a g a t c c a g a a t a c c c a	660
	g a t g a t g c t t c t g t t a a t g g t g t t a g a a a g g a t a a g c a a a a t t t g g t t c a a g a a t g g c a a	720
5	g c t a a g c a t c a a g g t g c t c a a t a t g t t t g g a a t a g a a c t g c t t t g t t g c a a g c t g c t g a t	780
	g a t t c t a g t g t t a c t c a t t t g a t g g g t t t g t t t g a a c c a g c t g a t a t g a a g t a t a a t g t t	840
10	c a a c a a g a t c a t a c t a a g g a t c c a a c t t t g g c t g a a a t g a c t g a a g c t g c t t t g c a a g t t	900
	t t g t c t a g a a a t c c a a g a g g t t t t t a c t t g t t t g t t g a a g g t g g t a g a a t t g a t c a t g g t	960
15	c a t c a t g a t t t t a a g g c t t a t a t g g c t t t g a c t g a a g c t a t t a t g t t t g a t a a t g c t a t t	1020
	g c t a a g g c t a a t g a a t t g a c t t c t g a a t t g g a t a c t t t g a t t t t g g t t a c t g c t g a t c a t	1080
20	a g t c a t g t t t t t t c t t t t g g t g g t t a c a c t t t g a g a g g t a c t t c t a t t t t t g g t t t g g c t	1140
	c c a g g t a a g g c t t t g g a t a g t a a g t c t t a c a c t t c t a t t t t g t a t g g t a a t g g t c c a g g t	1200
	t a t g c t t t g g g t g g t g g t t c t a g a c c a g a t g t t a a t g g t a g t a c t a g t g a a g a a c c a t c t	1260
25	t a c a g a c a a c a a g c t g c t g t t c c a t t g g c t a g t g a a a c t c a t g g t g g t g a a g a t g t t g c t	1320
	g t t t t t g c t a g a g g t c c a c a a g c t c a t t t g g t t c a t g g t g t t c a a g a a g a a a c t t t t g t t	1380
30	g c t c a t a t t a t g g c t t t t g c t g g t t g t g t t g a a c c a t a c a c t g a t t g t a a t t t g c c a g c t	1440
	c c a g c t a c t g c t a c t a g t a t t c c a g a t t a a g g t a c c	1476

35 <210> 10
 <211> 1476
 <212> DNA
 40 <213> Ácido nucleico
 <400> 10

	g a a t t c t t g a t t c c a g c t g a a g a a g a a a a t c c a g c t t t t t g g a a t a g a c a a g c t g c t c a a	60
	g c t t t g g a t g t t g c t a a g a a g t t g c a a c c a a t t c a a a c t g c t g c t a a g a a t g t t a t t t t g	120
	t t t t t g g g t g a t g g t a t g g g t g t t c c a a c t g t t a c t g c t a c t a g a a t t t t g a a g g g t c a a	180
50	a t g a a t g g t a a g t t g g g t c c a g a a a c t c c a t t g g c t a t g g a t c a a t t t c c a t a c g t t g c t	240
	t t g t c t a a g a c t t a c a a t g t t g a t a g a c a a g t t c c a g a t t c t g c t g g t a c t g c t a c t g c t	300
55	t a c t t g t g t g g t g t t a a g g g t a a t t a c a g a a c t a t t g g t g t t t c t g c t g c t g c t a g a t a c	360
	a a t c a a t g t a a t a c t a c t a g a g g t a a t g a a g t t a c t t c t g t t a t t a a t a g a g c t a a g a a g	420
60	g c t g g t a a g g c t g t t g g t g t t g t t a c t a c t a c t a g a g t t c a a c a t g c t t c t c c a g c t g g t	480

65

ES 2 337 666 T3

	gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct	540
	caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatggt	600
5	atthttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca	660
	gatgatgctt ctgttaatgg tgtagaaaag gataagcaaa atthtggttca agaatggcaa	720
10	gctaagcatc aagggtgctca atatgtttgg aatagaactg cthttgttgca agctgctgat	780
	gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatggt	840
15	caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt	900
	ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggt	960
	cataatgatt ttaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt	1020
20	gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga tthttggttac tgctgatcat	1080
	agtcattgtt tttcttttgg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tggtttggct	1140
25	ccaggtaagg cthttggatag taagtcttac acttctattt tgtatggtaa tgggtccagg	1200
	tatgctttgg gtggtgggtc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct	1260
	tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atgggtggta agatgttgct	1320
30	gtthtttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatggtg ttcaagaaga aactthttgt	1380
	gtcatatta tggctthttgc tggttgtgtt gaaccataca ctgattgtaa tttgccagct	1440
35	ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc	1476

<210> 11
 40 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> Ácido nucleico
 45 <400> 11

	gaattcttga ttccagctga agaagaaaat ccagctthttt ggaatagaca agctgctcaa	60
50	gctthtggatg ttgctaagaa gttgcaacca attcaaactg ctgctaagaa tgttattttg	120
	thttttgggtg atgggtatggg tgttccaact gttactgcta ctagaatttt gaaggggtcaa	180
55	atgaatggta agttgggtcc agaaactcca ttggctatgg atcaattttcc atacgttgct	240
	ttgtctaaga cttacaatgt tgatagacaa gttccagatg ctgctgggtac tgctactgct	300
60	tacttgtgtg gtgttaaggg taattacaga actattgggtg tttctgctgc tgctagatac	360

65

ES 2 337 666 T3

	aatcaatgta atactactag aggtaatgaa gttactttctg ttattaatag agctaagaag	420
	gctggtaagg ctggttggtgt tgttactact actagagttc aacatgcttc tccagctggg	480
5	gcttacgctc atactgttaa tagaaattgg tactctgatg ctgatttgcc agctgatgct	540
	caaaagaatg gttgtcaaga tattgctgct caattgggtt acaatatgga tattgatggt	600
10	attttgggtg gtggtagaat gtacatgttt ccagaaggta ctccagatcc agaataccca	660
	gatgatgctt ctgttaatgg tggttagaag gataagcaaa atttgggttca agaatggcaa	720
15	gctaagcatc aagggtgctca atatgttttg aatagaactg ctttgttgca agctgctgat	780
	gattctagtg ttactcattt gatgggtttg tttgaaccag ctgatatgaa gtataatggt	840
	caacaagatc atactaagga tccaactttg gctgaaatga ctgaagctgc tttgcaagtt	900
20	ttgtctagaa atccaagagg tttttacttg tttgttgaag gtggtagaat tgatcatggg	960
	cataatgatt ttaaggctta tatggctttg actgaagcta ttatgtttga taatgctatt	1020
25	gctaaggcta atgaattgac ttctgaattg gatactttga ttttgggttac tgctgatcat	1080
	agtcatgttt tttctttttg tggttacact ttgagaggta cttctatttt tgggttggt	1140
	ccaggtaagg ctttggatag taagtcttac acttctattt tgtatggtaa tgggtccagg	1200
30	tatgcttttg gtggtgggtc tagaccagat gttaatggta gtactagtga agaaccatct	1260
	tacagacaac aagctgctgt tccattggct agtgaaactc atgggtggta agatgttgct	1320
35	gtttttgcta gaggtccaca agctcatttg gttcatgggt ttcaagaaga aacttttgtt	1380
	gctcatatta tggtcttttgc tgggtgtgtt gaaccatata ctgattgtaa tttgccagct	1440
40	ccagctactg ctactagtat tccagattaa ggtacc	1476

<210> 12

<211> 46

45 <212> DNA

<213> Cebador 5'-hAP

<400> 12

50 gcgcgaattc ttgattccag ctgaagaaga aaatccagct tttgg

46

<210> 13

55 <211> 47

<212> DNA

<213> Cebador 3'-hAP

60 <400> 13

gcgcggtacc ttaatctgga atactagtag cagtagctgg agctggc

47

65 <210> 14

<211> 26

ES 2 337 666 T3

	<212> DNA	
	<213> Cebador 5'-S92A	
5	<400> 14	
	ccagatgctg ctggtactgc tactgc	26
10	<210> 15	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Cebador 3'-S92A	
15	<400> 15	
	gcagtagcag taccagcagc atctggaact tgc	34
20	<210> 16	
	<211> 35	
	<212> DNA	
25	<213> Cebador 5'-G322H	
	<400> 16	
30	gatcatggtc atcatgattt taaggcttat atggc	35
	<210> 17	
	<211> 35	
35	<212> DNA	
	<213> Cebador 3'-G322H	
	<400> 17	
40	gccatataag ccttaaaatc atgatgacca tgatc	35
	<210> 18	
45	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Cebador 5'-H320N/G322H	
50	<400> 18	
	gatcatggtc ataagattt taaggcttat atggc	35
55	<210> 19	
	<211> 35	
	<212> DNA	
60	<213> Cebador 5'-H320N/G322F	
	<400> 19	
65	gccatataag ccttaaaatc attatgacca tgatc	35
	<210> 20	
	<211> 31	

ES 2 337 666 T3

<212> DNA

<213> Cebador 5'-Expr

5 <400> 20

gcgcgcctag gagatctaac atccaaagac g

31

10 <210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Cebador 3'-Expr

15

<400> 21

cgcgcgctag cggatccgca caaacgaag

29

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65